

U N I V E R S I D A D   N A C I O N A L   D E   L A   P L A T A  
F A C U L T A D   D E   C I E N C I A S   V E T E R I N A R I A S

T E S I S

REGULACION DE LA TRANSCRIPCION VIRAL EN EL BACTERIOFAGO SP01

JUAN CARLOS ALONSO

1982

El presente trabajo de Tesis para  
optar al grado de Doctor en  
Bacteriología Clínica e Industrial  
ha sido realizado en el laboratorio  
de Química Biológica de la  
Facultad de Ciencias Exactas,  
bajo la dirección de los profesores  
Dres Oscar Grau y Alberto N. Sarachu.

*a mis padres*

*a María*

Mi reconocimiento

a la Facultad de Ciencias Veterinarias por haberme incorporado a sus claustros,

a la Facultad de Ciencias Exactas por los recursos insumidos en la realización de este trabajo,

a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por las becas otorgadas que permitieron mi iniciación en la investigación.

Mi agradecimiento

a los Doctores Eduardo Zaccardi, Alberto N. Sarachu y Oscar Grau por brindarme la posibilidad de iniciarme en la investigación científica,

a los Doctores Alberto N. Sarachu y Oscar Grau por su dirección y permanente apoyo en el plano científico y personal durante el desarrollo de este trabajo,

a la Dra. María C. Añón por los valiosos comentarios y críticas formuladas sobre el borrador del presente trabajo,

a mis compañeros y personal del laboratorio de Química Biológica por su colaboración y amistad,

a mis maestros.

- NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE POR CATEGORIAS -

- PROFESOR TITULAR "DEDICACION EXCLUSIVA" -

Apellido y nombre

|                           |                        |              |
|---------------------------|------------------------|--------------|
| ANGULO, Eusebia           | Investigadora          | Titular      |
| ERRECALDE, Jorge E.       | Microbiología          | Interino     |
| ETCHEVERRIGARAY, María E. | Virología              | Reemplazante |
| MENENDEZ, Néstor A.       | Anat. y Fisiol. Patol. | Interino     |
| PRACCA, Lydia C.          | Clín. Pequen. Animales | Reemplazante |
| QUINTEROS, Indalecio R.   | Genét. y Biometría     | Titular      |
| ZACCARDI, Eduardo M.      | Fisiología             | Titular      |

- PROFESOR TITULAR "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

|                          |                           |                |
|--------------------------|---------------------------|----------------|
| AGUIRRE, Walter G.       | Microb. Especial          | Titular        |
| ALBERDI, Cecilio         | Tec. y Sanid. Aliment.    | Interino       |
| ANDREATTA, Jorge N.      | Semiología y Propedéutica | Interino       |
| ARGERI, Nelson J.        | Análisis Clínicos I y II  | Reemplazante   |
| BERTOLINI, José M.       | Anatomía Comparada        | Interino       |
| DELPRATO, Ismael O.      | Anat. Descript. y Top.    | EMERITO        |
| JENSEN, Alicia D.        | Bioestadística            | Interino       |
| LED, Jorge E.            | Parasit. y Enf. Parasit.  | Interino       |
| MANZULLO, Alfredo        | Inmunología I y II        | EMERITO-Reemp. |
| MAROTTA, Eduardo G.      | Zootec. Espec. I Pte.     | Interino       |
| OCHOA, Mario E.          | Director Inst. Sta. Cat.  | Interino       |
| OTTINO, Julio F.         | Histología y Embriología  | Interino       |
| PENNIMPEDE, Enrique F.F. | Inmunol. Gral y Aplic.    | Reemplazante   |
| RODRIGUEZ, Benjamín R.   | Zootec. Espec. II Pte.    | Interino       |
| TORRES, Jorge F.         | Int. a la Bioquímica      | Interino       |

- PROFESOR TITULAR "DEDICACION SIMPLE" -

|                       |                              |          |
|-----------------------|------------------------------|----------|
| AGUIRRE, Walter G.    | Microbiología Aplicada       | Titular  |
| ALBERDI, Cecilio      | Tecnol. y Sanid. Aliment.    | Interino |
| CARROZZA, Jesús S.W.  | Introduc. a la Biofísica     | Titular  |
| ERRECALDE, Jorge E.   | Enfermedades Infecciosas     | Interino |
| GIMENO, Emilio J.     | Higiene y Epid. y S. Pública | Titular  |
| ISEAS, Fortunato B.   | Patología Médica             | Interino |
| MARTINO, Olindo A.L.  | Salud Pública                | Interino |
| MORELLI, Héctor A.    | Zootec. Espec. III Pte.      | Interino |
| OSTROWSKI, Jorge E.B. | Patolog. Reprod. y Obst.     | Interino |

|                          |                        |                 |
|--------------------------|------------------------|-----------------|
| PANZONI, Erico E.        | Economía Agraria       | Titular         |
| RUAGER, Jorge            | Patología General      | Interino        |
| SARACHU, Alberto N.      | Genética Microbiana    | Interino-1.s.s. |
| SCIAMMARELLA, Alfredo M. | Medicina Operatoria    | Interino        |
| TESORIERO, Catalina      | Físic. y Quím. Aplic.  | Reemplazante    |
| TOUCEDO, Guillermo A.    | Patol. Quirúrg. y Pod. | Titular         |

- PROFESOR ASOCIADO "DEDICACION EXCLUSIVA" -

|                 |                        |          |
|-----------------|------------------------|----------|
| MARTIN, Alcides | Anat. y Fisiol. Patol. | Interino |
|-----------------|------------------------|----------|

- PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION EXCLUSIVA" -

|                      |                         |              |
|----------------------|-------------------------|--------------|
| BOCCIA, Francisco O. | Clín. Pequeños Animal.  | Reemplazante |
| IDIART, Julio R.     | Anat. y Fisiol. Patol.  | Interino     |
| LAGRECA, Liliana     | Zotec. Gral. y Agrost.  | Interino     |
| LASTA, Jorge A.      | Higiene Epid. y S.Públ. | Interino     |
| MONINA, Marta I.     | Clín. Grandes Animales  | Interino     |

- PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION TIEMPO PARCIAL" -

|                             |                          |                 |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------|
| BRANDETTI, Eugenio          | Anat. y Fisiol. Patol.   | Interino        |
| CHAMPREDONDE, Hugo N.       | Patología General        | Interino        |
| DIBBERN, Alberto R.         | Zotec. Espec. II Pte.    | Reemplazante    |
| DURANTE, Eduardo J.         | Patol. Quirúrg. y Pod.   | Interino-1.c.s. |
| ERRECALDE, Jorge O. (h)     | Farmacol. F. y Terapéut. | Interino-1.c.s. |
| FELDMAN, Raquel E.          | Parasitolog. Comparada   | Interino        |
| FERNANDEZ, Enrique J.       | Enfermedades Infecciosas | Interino        |
| GOMEZ, Carlos M.            | Inmunología II           | Interino        |
| MAGGI, Nilda B.             | Serv. Central de Cirug.  | Reemplazante    |
| MARTINO, Juan J.            | Microbiología            | Titular         |
| NOIA, Miguel A.             | Introd. a la Biofísica   | Interino        |
| ORTEGA, César F.            | Semiolog. y Propedéut.   | Interino        |
| PENNIMPEDE, María T. del A. | Tecnolog. y Sanid. Alim. | Interino        |
| PIOVANO, Nicolás M.         | Introd. a la Bioquímica  | Interino        |
| REINOSO, Enso M.            | Micol. Médica e Indust.  | Reemplazante    |
| RUAGER, Jorge               | Anat. y Fisiol. Patolog. | Interino        |

- PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION SIMPLE" -

|                       |                           |          |
|-----------------------|---------------------------|----------|
| BACIGALUPO, Néstor R. | Tecnol. y Sanid. Aliment. | Interino |
| BAIGUN, Roberto       | Patol. Reprod. y Obst.    | Interino |
| BRANDETTI, Eugenio    | Parasit. y Enferm. Paras. | Interino |

|                             |                           |              |
|-----------------------------|---------------------------|--------------|
| FERNANDEZ DE LIGER, José H. | Clín. Grandes Animales    | Titular      |
| FINOCHIETTO, Héctor D.      | Patología Médica          | Interino     |
| GOMEZ, Carlos M.            | Inmunol. Gral y Aplicada  | Interino     |
| GRILLO, Virginia E.         | Zotec. Espec. III Pte.    | Interino     |
| LASTA, Jorge A.             | Microbiología Aplicada    | Interino     |
| MAGGI, Nilda B.             | Patolog. Quirúrg. y Pod.  | Interino     |
| MALIANDI, Florestán S. (h)  | Higiene Epid. y Sal.Púb.  | Interino     |
| MOISO, Alejandro C.         | Microbiología             | Titular      |
| NOVARINI, Miguel A.         | Farmacol. F. y Terapéut.  | Interino     |
| OLIVA, Graciela A.          | Virología                 | Interino     |
| PEREZ CASTILLO, Nelly E.    | Física y Química Aplic.   | Reemplazante |
| PRIO LOFEUDO, Graciela E.   | Zotec. Espec. III Pte.    | Reemplazante |
| RENNER, Juan E.             | Clínica Grandes Animales  | Reemplazante |
| ROJAS, Edmundo R.           | Fisiología                | Interino     |
| RUTTER, Bruno               | Patolog. Reprod. y Obst.  | Interino     |
| TARSIA, Elba E.             | Introd. a la Biofísica    | Interino     |
| VENTURINI, Lucila M.        | Parasit. y Enferm. Paras. | Interino     |
| VILLAR, Marta E.            | Análisis Clínicos I Pte.  | Interino     |
| VILLAR, Marta E.            | Análisis Clínicos II Pte. | Interino     |
| YANNARELLA, Francisco G.    | Parasit. y Enferm. Paras. | Interino     |

- JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION EXCLUSIVA" -

|                       |                           |          |
|-----------------------|---------------------------|----------|
| BASCHAR, Héctor O.    | Clínica Grandes Animales  | Interino |
| FONROUGE, Reinaldo D. | Higiene Epid. y Sal. Púb. | Interino |
| RONSINO, Roberto O.   | Sección Radioisótopos     | Interino |
| TEJEDOR, Eugenio D.   | Genética y Biometría      | Interino |

- JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION TIEMPO PARCIAL" -

|                      |                           |          |
|----------------------|---------------------------|----------|
| ALIVERTI, Héctor M.  | Zotec. Espec. II Pte.     | Interino |
| ALLEVATO, Hugo L.    | Higiene Epid. y Sal. Púb. | Interino |
| AMASINO, Carlos F.   | Enfermedades Infecciosas  | Interino |
| AULICINO, Oscar O.   | Tecnología y S. Aliment.  | Interino |
| BABUSCI, Máximo      | Fisiología                | Interino |
| BAMBILL, Emilia C.   | Zotec. Especial I Pte.    | Interino |
| BARRENA, Javier E.   | Anatomía Descript. y Top. | Interino |
| BERNAGOZZI, Jorge A. | Inmunolog. Gral y Aplic.  | Interino |
| BISCHOFF, Jorge R.   | Genética y Biometría      | Interino |
| BUGALLO, Antonio     | Patología General         | Interino |
| BUGALLO, Antonio     | Farmac. Farm. y Terap.    | Interino |
| CARBONE, Cecilia     | Animales de Laboratorio   | Interino |

|                             |                            |              |
|-----------------------------|----------------------------|--------------|
| CASTUMA, María E.           | Indrod. a la Bioquímica    | Interino     |
| COLL CARDENAS, Ernesto F.   | Introd. a la Biofísica     | L.c.s.       |
| DE ANTONI, Graciela L.      | Genética Microbiana        | Interino     |
| del CASTILLO, Federico C.   | Histología y Embriolog.    | Interino     |
| DRAGONETTI, Ana María       | Clin. Pequeños Animales    | Interino     |
| FORNER, Jesús J.A.          | Tecnol. y S. Alimentos     | Interino     |
| FREGOSSO, Mario O.          | Anatomía Descript. y Top.  | Interino     |
| FRIGOLI, Alicia E.          | Introduc. a la Biofísica   | Interino     |
| FUENTES, Leticia S.         | Introduc. a la Biofísica   | Interino     |
| GARCIA VALENTI, Horacio S.  | Zootec. Espec. II Pte.     | Interino     |
| GIANOTTI, Ricardo S.        | Tecnol. y S. Alimentos     | Interino     |
| GIMENO, Eduardo J.          | Anatomía y Fisiol. Pat.    | Interino     |
| GIMENO, Eduardo J.          | Patología General          | Interino     |
| GOITIA, Oscar F.            | Zootec. Especial II Pte.   | Reemplazante |
| GUAJARDO, Margarita H.      | Introduc. a la Bioquímica  | Interino     |
| GUGLIELMETTI, Elda M.C.     | Introduc. a la Biofísica   | Interino     |
| HERRERA CANALES, Félix E.   | Anatomía Comparada         | Interino     |
| LACCHINI, Raúl A.           | Zootec. Gral y Agrost.     | Interino     |
| LESTCHINSKY, Eva            | Análisis Clínicos I Pte.   | Interino     |
| LINZITTO, Oscar R.          | Histología y Embriología   | Interino     |
| MARCANTONI, Hugo            | Histología y Embriología   | Interino     |
| MARCON, Olga E.             | Física y Química Aplicada  | Reemplazante |
| MASSONE, Raúl A.            | Clínica Grandes Animales   | Reemplazante |
| MILLAN , Margarita D.       | Anatomía Descript. y Top.  | Interino     |
| MONTESINO RAMOS, Ignacio G. | Clínica Grandes Animales   | Interino     |
| MUNARD, Carlos J.           | Patol. Rep. y Obstetricia  | Interino     |
| NURO, Alicia M.             | Clínica Pequeños Animales  | Interino     |
| ORELLANA, Jorge             | Histología y Embriología   | Interino     |
| PASSIUCO, Mabel N.          | Introd. a la Bioquímica    | Interino     |
| PELLON, Horacio S.          | Tecnolog. y S. Alimentos   | Interino     |
| PERFUMO, Carlos J.          | Anatom. y Fisiol. Patolog. | Interino     |
| PIACENTINI, Enrique         | Tecnolog. y S. Alimentos   | Interino     |
| PIAZZA, Delia D.            | Microbiología Especial     | Interino     |
| POLI, Mario A.              | Genética y Biometría       | Interino     |
| PONS, Eduardo E.            | Clínica Grandes Animales   | Interino     |
| RADMAN, Nilda E.            | Parasit. y Enferm. Paras.  | Interino     |
| RAMIREZ, Luis F.            | Anatomía Descript. y Top.  | Reemplazante |
| REPETTO SANCHEZ, Olindo     | Medicina Operatoria        | Interino     |
| RODRIGUEZ TOLEDO, Jorge A.  | Medicina Operatoria        | Interino     |
| SALESSI, Enrique            | Fisiología                 | Reemplazante |



|                        |                             |              |
|------------------------|-----------------------------|--------------|
| SARA, Raúl C.          | Patolog. Rep. y Obstetric.  | Interino     |
| SCAVIA, Ricardo C.     | Anatomía Comparada          | Interino     |
| TABORCIA, Juan A.      | Patología General           | Interino     |
| TARABUSO, Ricardo      | Semiología y Propedéut.     | Interino     |
| TREBUCQ, Rubén A.      | Inmunología Gral y Aplicada | Interino     |
| VENTURINI, María C.    | Inmunología Gral y Aplicada | Reemplazante |
| VOCOS GIMENEZ, Sara T. | Zotec. Espec. II Pte.       | Interino     |

- JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION SIMPLE" -

|                                 |                             |                   |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| ALLENDE, María C.               | Ser. Central de Cirugía     | Interino          |
| AVILA, Silvia M.                | Microbiología Especial      | Interino          |
| BARDON, Juan C.                 | Patología Médica            | Interino          |
| BERNAGOZZI, Jorge A.            | Inmunología Gral y Aplicada | Reemplazante      |
| BRAVO BARDALES, Tomás           | Economía Agraria            | Interino          |
| BUTLER, Eduardo A.              | Patolog. Quirúrg. y Pod.    | Interino          |
| CALONGE, Carlos A.              | Patología Médica            | Interino          |
| CASTAÑEDA, Alberto C.           | Clínica Pequeños Animales   | Interino          |
| CESAR, Norberto                 | Patología Médica            | Reemplazante      |
| CATALA, Gustavo G.              | Patolog. Reprod. y Obst.    | Reemplazante      |
| CUETO, Eduardo                  | Zotec. Especial II Pte.     | Interino          |
| CHIARAVALLI, Juan C.            | Zotec. Gral. y Agrost.      | Interino          |
| DELGADO CAFFE, Osvaldo L.       | Higiene Epid. y S. Pública  | Interino          |
| FERNANDEZ DE LIGER, José H. (h) | Patología Médica            | Interino          |
| FORMENTI, Liliana E.            | Microbiología Aplicada      | Reemplazante      |
| GALAN, Jorge E.                 | Enfermedades Infecciosas    | Interino-l.s.g.s. |
| GARCIA FRONTINI, María V.       | Parasit. y Enf. Parasit.    | Interino          |
| GALLO, Guillermo F.             | Fisiología                  | Interino          |
| GRAMIGNA, Tomás F.              | Taller de Educación         | Interino          |
| GIMENEZ, Mabel A.               | Zotec. Especial I Pte.      | Interino          |
| HERNANDEZ, Zulma H.             | Salud Pública               | Interino          |
| LACCHINI, Raúl A.               | Zotec. Espec. II Pte.       | Interino          |
| LOJO, María Mercedes            | Genética Microbiana         | Interino          |
| MARILUNGO, Aníbal J.            | Medicina Operatoria         | Interino          |
| MELANI, Gustavo H.              | Patología Médica            | Interino          |
| MORRIS, Marta Rita              | Micolog. Med. e Indust.     | Interino          |
| NICODEMO, María del C.          | Zotec. Espec. III Pte.      | Interino          |
| NOSETTO, Edgardo O.             | Clínica Grandes Animales    | Interino          |
| OCAMPO, Jesús M.P.              | Introducción a la Biofísica | Interino          |
| REGGIOSO, Ana M.                | Introducción a la Biofísica | Reemplazante      |
| RONSINO, Roberto O.             | Fisiología                  | Interino          |

|                     |                           |          |
|---------------------|---------------------------|----------|
| SALAS, Laura V.     | Semiolog. y Propedéut.    | Interino |
| SANCHO, José J.I.   | Medicina Operatoria       | Interino |
| TOBIA, Marta B.     | Microbiología Aplicada    | Interino |
| TREBUCQ, Rubén A.   | Inmunología I             | Interino |
| TUNES, María del L. | Microbiología             | Interino |
| VARELA, Juan A.H.   | Microbiología             | Interino |
| WARD, Miguel V.     | Farmac. Farm. y Terapéut. | Interino |

- AYUDANTE DIPLOMADO "DEDICACION EXCLUSIVA" -

|                      |                           |          |
|----------------------|---------------------------|----------|
| AVILA, Silvia M.     | Histología y Embriología  | Interino |
| CASTELLANO, María C. | Clínica Pequeños Animales | Interino |
| CATALANO, Vicente A. | Histología y Embriología  | Interino |
| CERRUTTI, Augusto S. | Sección Radioisótopos     | Interino |

- AYUDANTE DIPLOMADO "DEDICACION TIEMPO PARCIAL" -

|                           |                              |              |
|---------------------------|------------------------------|--------------|
| BERISSO, Marcela M.       | Enfermedades Infecciosas     | Interino     |
| CABRAL, Marta S.          | Tecnolog. y S. Alimentos     | Interino     |
| CAMINO A, Ricardo A.      | Microbiología Especial       | Interino     |
| CORREA, Oscar M.          | Introducción a la Bioquímica | Interino     |
| GONZALEZ, Ester T.        | Virología                    | Interino     |
| GUADARRAMA, María del C.  | Histología y Embriología     | Interino     |
| HUERTA, Alicia N.         | Introducción a la Bioquímica | Interino     |
| MILLAN, Roberto G.        | Histología y Embriología     | Interino     |
| MARENGO, Alejandro G.     | Higiene Epidem. y S. Pública | Interino     |
| PETRUCCELLI, Miguel A.    | Anatom. y Fisiol. Patol.     | Interino     |
| RAMIREZ, Luis E.          | Clínica Pequeños Animales    | Interino     |
| RENARD, Jorge L.          | Tecnolog. y S. Aliment.      | Interino     |
| RIVADENEIRA, Elisabeth A. | Clínica Grandes Animales     | Reemplazante |
| RULE, Roberto             | Farmacol. Farm. y Terap.     | Reemplazante |
| TABORCIA, Juan A.         | Enfermedades Infecciosas     | Interino     |
| URQUIOLA, Horacio M.      | Fisiología                   | Reemplazante |
| ZOHUAR, Edith E.          | Clínica Pequeños Animales    | Interino     |

- AYUDANTE DIPLOMADO "DEDICACION SIMPLE" -

|                          |                         |              |
|--------------------------|-------------------------|--------------|
| ALONSO, Juan C.          | Genética Microbiana     | Interino     |
| ALT, Celia M.            | Microbiol. Especial     | Interino     |
| ALLEVATTO, Susana del C. | Zootec. Gral y Agrost.  | Reemplazante |
| ANTONINI, Alicia G.      | Genética y Biometría    | Interino     |
| ARCHELLI, Susana Mónica  | Parasitología Comparada | Interino     |

|                           |                              |              |
|---------------------------|------------------------------|--------------|
| BEDOTTI, Daniel O.        | Clínica Grandes Animales     | Interino     |
| BUSCAGLIA, Celina         | Zootec. Espec. III Pte.      | Interino     |
| CALVO, Carlos             | Anatomía y Fisiología Pat.   | Interino     |
| MINOA, Ricardo A.         | Animales de Laboratorio      | Interino     |
| TALANO, Vicente A.        | Sección Audiovisuales        | Interino     |
| ERRUTTI, Augusto S.       | Fisiología                   | Interino     |
| COLOCCIA PAYBA, Lilian G. | Anatomía y Fisiología Pat.   | Interino     |
| CORTEZ, Guillermo F.      | Higiene Epid. y S. Pública   | Interino     |
| COURREGES, Marta M.       | Anatomía y Fisiología Pat.   | Interino     |
| CREDARO, Cristina N.      | Análisis Clínicos II Pte.    | Interino     |
| D'AGOSTINO, Liliana E.    | Introducción a la Bioquímica | Interino     |
| DELGADO CAFFE, Osvaldo L. | Bioestadística               | Interino     |
| DI LEO, Julio A.          | Zootec. Espec. I Pte.        | Interino     |
| DOMINELLI, Heraldó A.     | Patolog. Quirúrg. y Pod.     | Interino     |
| ELSO, Liliana E.          | Enfermedades Infecciosas     | Interino     |
| FERREYRA, Juan C.         | Farmacolog. Farm. y Terap.   | Reemplazante |
| FRIGOLI, Alicia E.        | Introducción a la Biofísica  | Interino     |
| GONZALEZ, Ester T.        | Microbiología Aplicada       | Interino     |
| GUILLEN, Griselda         | Análisis Clínicos I Pte.     | Interino     |
| IRASTORZA, Jorge A.       | Patología Médica             | Reemplazante |
| IRIGOYEN, Isabel A.       | Introducción a la Bioquímica | Interino     |
| KNAVERHASE, Federico L.   | Patolog. Reprod. y Obstet.   | Interino     |
| LASTA, Gregorio           | Semiología y Propedéut.      | Reemplazante |
| MEZZERA, Ana M.           | Clínica Pequeños Animales    | Interino     |
| PENSA, Daniel A.          | Micol. Médica e Indust.      | Interino     |
| PEREZ, León               | Introducción a la Biofísica  | Reemplazante |
| PIAZZA, Delia D.          | Microbiología Aplicada       | Reemplazante |
| ROMERO, Jorge E.          | Parasitología y Enferm. Par. | Interino     |
| SANGUINETTI, Héctor R.    | Anatomía y Fisiología Patol. | Interino     |

DIRECCION DE ENSEÑANZA - 12 de octubre de 1981 -

### Lista de símbolos y siglas

ATP : adenosina trifosfato

bp : pares de bases

°C : grados centígrados

Ci : Curies

μCi : microcuries

Cm : cloranfenicol

Cou : coumermicina

cpm : cuentas por minuto

DA : fenotipo DA: fenotipo caracterizado por terminación anticipada (respecto al silvestre) de la síntesis de DNA

DD : fenotipo DD: fenotipo caracterizado por iniciación retardada (respecto al silvestre) de la síntesis de DNA

Dint : fenotipo Dint: fenotipo caracterizado por síntesis de DNA anormal

DNA : ácido deoxirribonucleico

D0 : fenotipo D0: fenotipo defectivo en síntesis de DNA

DO<sub>500nm</sub> : densidad óptica a la longitud de onda de 500 nanometros

dUMP : ácido deoxiuridílico

g : gramos

μg : microgramo

gp : producto del gen: entidad por la cual se expresa el gen

hmU : 5-hidroximetil uracilo

K : kilodaltons

Kpb : kilopares de bases

l : litro

M : molar

mg : miligramo

m.i. : multiplicidad de infección  
ml : mililitro  
min : minuto  
mmol : milimoles  
mRNA : ácido ribonucleico mensajero  
Nal : ácido nalidíxico  
NG : N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina  
nm : nanometro  
Novo : novobiocina  
Oxo : ácido oxolínico  
Pe : promotor temprano  
p.i. : post-infección  
PM : peso molecular  
Pm : promotor medio  
Pl : promotor tardío  
rRNA : ácido ribonucleico ribosomal  
RNA : ácido ribonucleico  
rpm : revoluciones por minuto  
TCA : ácido tricloroacético

INDICE

página

PRESENTACIÓN . . . . . 1

INTRODUCCIÓN

I, COMPLEJO DE REPLICACIÓN . . . . . 2

    INICIADORES DE LA SINTESIS DE DNA . . . . . 3

    ELONGACION DE LA CADENA DE DNA . . . . . 4

    PROTEINAS QUE AFECTAN LA CONFORMACION DEL DNA . . . 5

II, EL BACTERIOFAGO SPO1 . . . . . 14

    EFECTOS DE SPO1 SOBRE LA CELULA HUESPED . . . . . 15

    RASGOS GENERALES SOBRE EL DESARROLLO VIRAL

        a) Síntesis de RNAs virales . . . . . 16

        b) Síntesis de proteínas . . . . . 19

        c) Replicación del DNA viral . . . . . 21

    REGULACION DE LA TRANSCRIPCION

        a) Genes regulatorios . . . . . 23

        b) Mapeo de los promotores virales . . . . . 27

        c) Detención de la síntesis de las distintas  
            clases de RNAs . . . . . 28

MATERIALES Y METODOS

I, BACTERIAS Y BACTERIOFAGOS . . . . . 29

II, MEDIOS DE CULTIVO . . . . . 30

III, SOLUCIONES . . . . . 31

IV, COMPUESTOS MARCADOS CON ISÓTOPOS RADIOACTIVOS . . 32

V, ANTIBIÓTICOS . . . . . 32

VI, DROGAS . . . . . 33

VII, ENZIMAS . . . . . 33

|  | página |
|--|--------|
| VIII. PREPARACIONES . . . . .                    | 33     |
| a) BACTERIOFAGOS . . . . .                       | 33     |
| b) DNA de SPO1 . . . . .                         | 34     |
| c) RNA . . . . .                                 | 35     |
| RNAs marcados . . . . .                          | 35     |
| RNAs competidores . . . . .                      | 37     |
| IX. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES                |        |
| a) AISLACION DE MUTANTES . . . . .               | 38     |
| Bacteriofagos mutantes . . . . .                 | 38     |
| Bacterias mutantes . . . . .                     | 39     |
| b) ENSAYOS EN PLACA . . . . .                    | 40     |
| Bacterias viables . . . . .                      | 40     |
| Título de un lisado . . . . .                    | 40     |
| Centros infectados . . . . .                     | 41     |
| Fagos libres . . . . .                           | 41     |
| Bacterias indicadoras . . . . .                  | 41     |
| c) COMPLEMENTACION . . . . .                     | 42     |
| En medio sólido . . . . .                        | 42     |
| En líquido . . . . .                             | 42     |
| d) RETROCRUZA . . . . .                          | 43     |
| e) SINTESIS DE DNA . . . . .                     | 43     |
| f) SINTESIS DE RNA . . . . .                     | 44     |
| g) SINTESIS DE PROTEINAS . . . . .               | 45     |
| h) ENSAYO DE HIBRIDIZACION-COMPETICION . . . . . | 45     |

## RESULTADOS

### CAPÍTULO I

|   |    |
|---|----|
| ACCIÓN DE INHIBIDORES DE LA REPLICACIÓN SOBRE EL<br>DESARROLLO DEL BACTERIOFAGO SPO1 EN DIFERENTES<br>CEPAS DE <i>B. subtilis</i> . . . . . | 46 |
|---|----|

|   |    |
|---|----|
| a) EFECTOS DE Nal Y Novo SOBRE EL DESARROLLO<br>DE SPO1 EN DISTINTAS CEPAS DE <i>B. subtilis</i> . . . . .                        | 47 |
| b) EFECTOS DE Nal Y Novo SOBRE LA SINTESIS<br>DE DNA EN <i>B. subtilis</i> INFECTADO CON SPO1(+) . . . . .                        | 50 |
| c) BUSQUEDA DEL GEN/ES QUE CODIFIQUE/N A LA<br>SUBUNIDAD CON FUNCION DE CORTE Y REUNION<br>DE LA SPO1 DNA TOPOISOMERASA . . . . . | 55 |
| DISCUSION DE LOS RESULTADOS . . . . .   | 58 |

## CAPÍTULO II

|   |    |
|---|----|
| EFECTOS DE NOVO SOBRE EL PROGRAMA DE TRANSCRIP-<br>CIÓN VIRAL . . . . .   | 68 |
| a) EFECTOS DE Novo SOBRE LA SINTESIS DE DNA,<br>RNA Y PROTEINAS EN <i>B. subtilis</i> 168M . . . . .                                  | 69 |
| Síntesis de DNA . . . . .   | 69 |
| Síntesis de RNA . . . . .   | 69 |
| Síntesis de proteínas . . . . .   | 71 |
| b) EFECTO DE Novo SOBRE LA SINTESIS DE DNA,<br>RNA Y PROTEINAS EN <i>B. subtilis</i> 168M INFEC-<br>TADO CON SPO1 SILVESTRE . . . . . | 73 |
| Síntesis de DNA . . . . .   | 73 |
| Síntesis de RNA total . . . . .   | 75 |
| Síntesis de proteínas . . . . .   | 75 |
| c) NIVEL DE TRANSCRIPCION VIRAL EN <i>B. subtilis</i><br>168M INFECTADO CON SPO1 SILVESTRE EN PRE-<br>SENCIA DE Novo . . . . .        | 77 |
| d) PROGRAMA DE TRANSCRIPCION VIRAL . . . . .  | 79 |
| DISCUSION DE LOS RESULTADOS . . . . .   | 86 |

## CAPITULO III

|   |    |
|---|----|
| I. ESTUDIOS DE TRANSCRIPCIÓN VIRAL TARDÍA EN<br>MUTANTES DEFICIENTES EN REPLICACIÓN . . . . . | 93 |
|---|----|



|   | página |
|---|--------|
| a) CARACTERIZACION GENETICA DE LOS MUTANTES   |        |
| DEFICIENTES EN REPLICACION . . . . .  | 93     |
| Complementación en medio sólido . . . . .   | 94     |
| b) CARACTERIZACION FENOTIPICA . . . . .   | 94     |
| Síntesis de DNA en <i>B. subtilis</i> infectado<br>con el bacteriofago silvestre o mutan-<br>tes DO . . . . .           | 94     |
| Síntesis de RNA total en <i>B. subtilis</i> in-<br>fectado con el bacteriofago silvestre<br>o con mutantes DO . . . . . | 95     |
| Nivel de transcripción viral . . . . .  | 97     |
| Programa de transcripción viral . . . . .   | 101    |
| DISCUSION DE LOS RESULTADOS . . . . .   | 108    |
| II, ESTUDIOS DE TRANSCRIPCIÓN VIRAL EN EL MUTAN-  |        |
| TE HA20 . . . . .   | 116    |
| a) COMPLEMENTACION . . . . .  | 116    |
| b) NIVEL DE TRANSCRIPCION . . . . .   | 117    |
| c) PROGRAMA DE CLASES DE RNAs . . . . .   | 119    |
| DISCUSION DE LOS RESULTADOS . . . . .   | 123    |
| DISCUSIÓN   |        |
| I. NECESIDAD DEL SISTEMA DE UNA DNA TOPOISOMERASA . .   | 132    |
| II. CORRELACIÓN ENTRE EL GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO Y LA TRANSCRIPCIÓN VIRAL . . . . .                                 | 134    |
| III. NECESIDAD DE LA REPLICACIÓN VIRAL PARA LA TRANSCRIPCIÓN VIRAL TARDÍA . . . . .                                     | 137    |
| CONCLUSIONES . . . . .  | 141    |
| BIBLIOGRAFÍA . . . . .  | 143    |

## LISTA DE FIGURAS Y CUADRO

| Figura  | página |
|---|--------|
| 1    Modelo de acción de la DNA girasa . . . . .  | 11     |
| 2    Regulación de la transcripción viral . . . . .   | 24     |
| 3    Efecto de Novo sobre el desarrollo<br>de SPO1 silvestre . . . . .  | 49     |
| 4    Síntesis de DNA en <i>B. subtilis</i> 168M y<br>PB1706 infectados por SPO1(+) en au-<br>sencia y presencia de Nal . . . . .    | 52     |
| 5    Síntesis de DNA en <i>B. subtilis</i> 168M y<br>QM27 infectados con SPO1(+) en pre-<br>sencia y ausencia de Novo . . . . .     | 53     |
| 6    Síntesis de DNA en <i>B. subtilis</i> 168M en<br>presencia de cantidades crecientes<br>de Novo . . . . .                       | 70     |
| 7    Efecto de Novo sobre la síntesis de<br>RNA y proteínas en <i>B. subtilis</i> 168M . . . . .                                    | 72     |
| 8    Síntesis de DNA del bacteriofago<br>SPO1 en <i>B. subtilis</i> 168M en presencia<br>de cantidades crecientes de Novo . . . . . | 74     |
| 9    Efecto de Novo sobre la síntesis de<br>RNA total y proteínas en <i>B. subtilis</i><br>infectado con SPO1 silvestre . . . . .   | 76     |
| 10   Nivel de transcripción viral del<br>bacteriofago SPO1(+) en presencia y<br>ausencia de Novo . . . . .                          | 78     |
| 11   Programa de transcripción viral del<br>bacteriofago silvestre . . . . .  | 80     |
| 12   Programa de transcripción viral del<br>bacteriofago silvestre en presencia<br>de Novo . . . . .                                | 83     |
| 13   Hibridización-competición mezcla del<br>fago silvestre en presencia y ausen-<br>cia de Novo . . . . .                          | 85     |
| 14   Síntesis de DNA en <i>B. subtilis</i> infecta-<br>do con SPO1(+) o con mutantes D0 . . . . .                                   | 96     |
| 15   Experimentos de hibridización-compe-<br>titión del fago silvestre y mutantes<br>D0 a tiempos tempranos . . . . .               | 102    |

| Figura | página |
|--------|--------|
|--------|--------|

|    |  |     |
|----|--|-----|
| 16 | Experimentos de hibridización-competición del fago silvestre y mutantes D0 a tiempos tardíos . . . . . | 105 |
| 17 | Nivel de transcripción viral del bacteriofago silvestre, HA20, F21 y HA20-F21 . . . . .                | 118 |
| 18 | Programa de transcripción viral del bacteriofago mutante HA20 . . . . .                                | 120 |
| 19 | Experimento de hibridización-competición mezcla del fago silvestre y del mutante HA20 . . . . .        | 122 |
| 20 | Posible modelo de transcripción poliestrónica . . . . .  | 131 |

Cuadro

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | Síntesis de DNA y RNA durante el desarrollo del bacteriofago SP01 . . . . . | 18 |
|---|---|----|

## LISTA DE TABLAS Y ESQUEMA

| Tabla   |   | página |
|---------|---|--------|
| 1       | Efectos de Nal y Novo sobre el desarrollo de SPO1 en <i>B. subtilis</i> 168M, QM27, PB1706 y JA60A . . . . .              | 48     |
| 2       | Efecto de Nal y Novo sobre el desarrollo de SPO1 J1 en <i>B. subtilis</i> PB1706 . . . . .                                | 56     |
| 3       | Progenie y tiempo de lisis de los mutantes DA en 168M con y sin agregado de Nal . . . . .                                 | 59     |
| 4       | Porcentajes de los experimentos de hibridización-competición del fago silvestre en presencia y ausencia de Novo . . . . . | 89     |
| 5       | Síntesis de RNA total en bacterias infectadas con SPO1 silvestre o con diferentes mutantes D0 . . . . .                   | 98     |
| 6       | Nivel de transcripción viral a distintos tiempos en bacterias infectadas con SPO1 silvestre o con mutantes D0 . . . . .   | 99     |
| 7       | Hibridización-competición de los <sup>3</sup> HRNAs 4-7 min y 25-28 min p.i. con distintos RNAs competidores . . . . .    | 107    |
| Esquema |   |        |
| 1       | Modelo sugerido sobre el reemplazo de la subunidad A . . . . .  | 62     |

## PRESENTACIÓN

En las distintas etapas de la expresión de los bacteriofagos la transcripción del genoma se realiza en zonas restringidas de DNA. Como consecuencia de ello, durante el ciclo lítico aparecen en forma escalonada diferentes clases de RNAs, existiendo controles positivos y negativos que regulan esta transcripción coordinada.

En este trabajo se estudian los mecanismos involucrados en el control de la transcripción durante las etapas tempranas y tardías del ciclo lítico producido por el bacteriofago SP01, la influencia que ejerce la replicación sobre la transcripción viral tardía y el requerimiento de un cierto estado topológico del DNA para su replicación viral.

Como introducción se realiza una revisión bibliográfica de, por una parte, el complejo de replicación y las enzimas que alteran el estado topológico del DNA, y por otra, de la maquinaria de transcripción del bacteriofago SP01, como así también los mecanismos de control conocidos.

La parte experimental se divide en tres secciones: En la primera se analizan los efectos de los inhibidores de replicación sobre el ciclo lítico del bacteriofago SP01 crecido sobre distintas cepas de *Bacillus subtilis*.

En el segundo capítulo se estudia la necesidad en el sistema de una enzima de replicación activa y cómo ésta interviene en la expresión genética. Esta función es llamada en el presente trabajo SP01 DNA topoisomerasa.

En la tercera sección se estudia la incapacidad para sintetizar RNAs de clases tardías en los bacteriofagos mutantes letales condicionales de tipo supresible deficientes en replicación (DO), y se analiza además, un posible control positivo de transcripción.

# INTRODUCCION

## I. COMPLEJO DE REPLICACION

Se han planteado numerosos interrogantes acerca de cómo replican su DNA los seres vivos. Si bien la mayoría de las respuestas aún se ignoran, se ha determinado un modelo de replicación en *Escherichia coli* (*E. coli*) que, en forma tentativa, se hace extensible a otros sistemas bacterianos. Este modelo se basa en la acción integrada de varias enzimas y proteínas, las cuales funcionan formando un complejo.

En el Simposio del Cold Spring Harbor de 1968 (Vol. 33) se establecieron las bases moleculares del mecanismo de acción de la DNA polimerasa I (DNA pol I) de *E. coli*. Esta enzima requiere un extremo 3' OH libre (como cebador o "primer"), deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y un DNA molde para comenzar el ensamblado de bases en dirección 5' → 3' de acuerdo al modelo de Watson y Crick. Hoy se sabe que, si bien la DNA pol I interviene en la replicación de plásmidos relajados de alto número de copias (ej. Col E1), no es la enzima encargada de replicar el genoma bacteriano, función que cumple la DNA pol III. Esta última presenta los mismos requerimientos antes descritos para la DNA pol I.

La enzima de transcripción, RNA polimerasa DNA dirigida (RNA pol), actúa por un mecanismo similar al anterior, aunque más simple. La mayor diferencia entre RNA pol y DNA pol, aparte del ensamblaje específico (uracilo o timina) es la capacidad de la primera de iniciar la síntesis de una cadena polinucleotídica sin requerir un extremo 3' OH libre para colocar el primer nucleótido. Esta

propiedad es utilizada en la replicación, ya que la RNA pol (u otras enzimas similares) sintetiza un fragmento de RNA cebador, a partir del cual actúa luego la DNA pol (166).

#### INICIADORES DE LA SINTESIS DE DNA

La replicación del cromosoma bacteriano comienza en un punto específico u origen de replicación, y requiere proteínas iniciadoras, libres o unidas a membrana, que serían las responsables de la síntesis del cebador y de modificar la conformación del DNA.

Si bien hemos mencionado a la RNA pol como enzima capaz de catalizar la síntesis del "primer", no es la única con tal actividad. Por ejemplo, mientras rifampicina (inhibidor de RNA pol) impide la síntesis del cebador en fagos filamentosos de *E. coli* (M13, fd, etc.) (168), no tiene acción sobre la replicación de fagos con simetría icosaédrica ( $\phi$ X174, G4, ST1, etc.). Estos últimos utilizan, para fabricar su "primer", al producto del gen bacteriano dnaG.

En sistemas de DNA de doble cadena, no solamente es necesario desenrollar el DNA para su replicación, sino que además se necesita separar las cadenas para formar el cebador. En *E. coli* se ha demostrado, por estudios genéticos, que se requiere la acción compuesta de las funciones codificadas por los genes dnaG, dnaB, dnaC y RNA pol. Esta última aceleraría la velocidad de síntesis del cebador (192), quizás modificando la conformación del DNA.

Los genes dnaB y dnaC codifican un grupo de proteínas preparadoras ("priming") para la síntesis del cebador,



proteínas  $i$ ,  $n$ ,  $n'$  y DBP (74). La proteína  $\text{dnaG}$  es capaz de incorporar oligonucleótidos que pueden ser ribo, desoxirribo, o una mezcla de ambos (191) y es la encargada de sintetizar el cebador propiamente dicho desde el origen de replicación (74), requiriendo la conjunción de las otras proteínas mencionadas para que la síntesis sea eficiente y ocurra a alta velocidad.

Evidentemente la iniciación de la replicación debe estar sujeta a controles precisos que aseguren que la duplicación cromosomal sea concordante con la duplicación celular. Recientemente, utilizando un plásmido como modelo experimental, se han presentado evidencias acerca de estos controles. Un fragmento de RNA que se une al cebador, por hibridización, sería el responsable de desestabilizar la unión del cebador con el DNA. Este RNA forma un pequeño globo, "loop", frenando, por falta de cebador, a la señal de iniciación (176). Como se había ya postulado en años anteriores, en la sucesiva división celular disminuiría la concentración de esta molécula represora y dejaría libre al origen de replicación (127). Además, se han presentado evidencias de que existen sitios específicos del sistema de recombinación que permiten el mantenimiento del replicón bacteriano como monómero. Este sistema es muy preciso y tiene alta eficiencia (7).

#### ELONGACION DE LA CADENA DE DNA

La cadena de DNA se elonga en dirección  $5' \rightarrow 3'$  sobre una hebra patrón  $3' \rightarrow 5'$  y de manera semiconservativa bidireccional. Esta síntesis comienza por la adición de restos

dNTPs al extremo 3' del tramo cebador gracias a la DNA pol III. Se requiere la acción de proteínas desenrollantes y separadoras de la doble hélice para que la cadena naciente progrese. Una vez que se ha formado un corto fragmento de Okazaki (166) de RNA-DNA, el primero es escindido y separado a partir de su extremo 5', al parecer por la función exonucleasa asociada a la DNA pol I, o por la RNasa H. Posteriormente la DNA pol I rellena los espacios digeridos y una DNA ligasa sella los fragmentos entre sí.

Este modelo no es extensible a otros sistemas. Por ejemplo, la replicación del plásmido Col E1 presenta una síntesis continua de una de las cadenas y la otra sería discontinua (68). La replicación del fago P2 es unidireccional y desde un punto fijo (112). El fago lambda ( $\lambda$ X174 y otros) se replica según el modelo del círculo rotatorio.

En *E. coli*, si bien se requiere una activa síntesis de proteínas para iniciar la replicación (78), ésta no es necesaria para mantener la elongación (77); hay otros sistemas (por ejemplo, plásmidos relajados) totalmente independientes de la síntesis de proteínas (18) o totalmente dependientes, como SP01 (83).

#### PROTEINAS QUE AFECTAN LA CONFORMACION DEL DNA

En los últimos años han sido extensamente analizados los cambios topológicos a que es sometido el DNA (22). Dichas modificaciones son biológicamente fundamentales en los mecanismos de transcripción, duplicación cromosomal y en su regulación, así como también en los procesos de reparación y

recombinación genética. Nuestra intención es hacer una rápida revisión de las enzimas o proteínas que intervienen en los cambios del estado conformacional del DNA, y poner especial énfasis en las DNA topoisomerasas, siempre tomando como modelo el propuesto para *E. coli*.

Para una más simple clasificación se las agrupa en proteínas que se unen a una o a las dos cadenas de DNA, y aquéllas que tienen función enzimática son clasificadas según su dependencia o independencia de energía química.

Dentro de las proteínas que se unen a una de las hebras tenemos a la proteína I (156), responsable de la desestabilización de la doble hélice. Impide una transcripción descontrolada por la RNA pol y guía la iniciación de la síntesis de DNA en un sitio específico. Además, la proteína dnaG sólo forma el cebador en presencia de esta proteína.

La proteína I mejora la elongación de la cadena de DNA por la DNA pol III y DNA pol II (44), pero no afecta la DNA pol I ni la DNA pol del fago T4.

Este bacteriofago codifica una proteína (producto del gen 32) que se une a una de las cadenas de su DNA y desestabiliza la doble hélice. Una mutación en este gen interfiere en la replicación y recombinación viral (147). En los fagos T5 y T7 se han descrito proteínas con función similar a la analizada (153).

Dentro de las proteínas que se unen a las dos cadenas del DNA podemos enumerar a la proteína II. Dado que es activa como monómero, dímero y tetramero, en un comienzo se pensó que eran tres proteínas diferentes con idéntica función (llamadas HU, HD y NS). Forma una estructura similar a los nucleosomas de células eucariotes (146) inhibiendo la síntesis

de DNA por la DNA pol III (10). Es capaz de mejorar la transcripción del fago lambda (145), aunque, curiosamente, en el bacteriofago SP01 se ha descrito un inhibidor inespecífico de la transcripción (TF1) (188) que tiene alta homología con esta proteína (46).

Dentro del grupo de las enzimas independientes de energía química tenemos a las DNA topoisomerasas I. Tanto las de procariotes como las de eucariotes están involucradas en la rotura y reunión de una de las cadenas de DNA. Las primeras son capaces de relajar el DNA superenrollado negativamente (128) pero esencialmente no afectan al DNA superenrollado positivamente (188). Todas las actividades catalíticas de este tipo de enzimas son dependientes de  $Mg^{++}$  y sus sitios de unión al DNA no son al azar (179).

Las enzimas de células eucariotes difieren en varios aspectos de las de procariotes: son activas en ausencia de  $Mg^{++}$  y aún en estas condiciones relajan al DNA superenrollado positivamente y parecerían no tener especificidad de unión al DNA (23).

Recientemente se han logrado aislar mutantes termosensibles en varias especies bacterianas (161, 177) que aportarán un mayor conocimiento al rol fisiológico de esta enzima.

Del grupo de las enzimas que modifican el estado topológico del DNA y requieren energía química tenemos a las DNA helicasas, a la proteína recA y a las DNA topoisomerasas II.

En *E. coli* se conocen cuatro helicasas: DNA helicasa I, II y III (1) y el producto del gen rep (152). En el fago T4 se ha descrito también una helicasa (T4 helicasa).

Existen pequeñas diferencias entre ellas, pero todas tienen función ATPasa dependiente y son capaces de abrir las dos cadenas de DNA, a modo de cuña. Algunas requieren una

región de DNA de cadena simple más grande, otras, más pequeña, o, como la rep, un corte, para comenzar a separar a las dos cadenas (32). Es poco lo que se conoce sobre la función biológica de estas proteínas, pero indiscutiblemente intervienen en la síntesis de DNA.

Se ha encontrado recientemente que las helicasas II y III actúan conjuntamente y son importantes en la iniciación de la replicación del cromosoma circular cerrado de *E. coli* (73).

La proteína recA es requerida para recombinación genética en general, para la reparación post-replicativa y para la inducción de fagos. Juega un rol importante en la división celular y en los procesos mutagénicos (131). La expresión de este gen es inducida por un DNA dañado, por un freno en la replicación o por inhibidores de la DNA girasa (116). Su función más prominente es la de catalizar, en presencia de ATP, la unión de pares de bases homólogas entre moléculas de DNA. Su resultado es la renaturalización o desnaturalización del DNA, por ejemplo, el apareamiento de cadenas simples a una doble cadena formando un heterodúplex de tres cadenas con el desplazamiento de una de éstas (95). También funciona como proteasa ATP dependiente (21); en presencia de DNA de simple cadena es capaz de inactivar y clivar a la proteína represora del fago lambda (142) y al producto del gen *lexA* (85). Se sugiere que este último estaría involucrado en el control de la expresión de la enzima.

Otra enzima que se une al DNA cambiando su estado conformacional es la RNA pol, pero será analizada más adelante.

Por último analizaremos a las DNA topoisomerasas II, enzimas que nos permiten responder a un gran número de

interrogantes. Hace casi 30 años que Watson y Crick propusieron el modelo de la estructura helicoidal del DNA (185), pero recién en la última década se han podido conocer detalles de sus cambios conformacionales. El DNA presenta dos configuraciones mayoritarias: una donde se lo encuentra circular abierto, 10,4 pares de bases (pb) por giro, y otra que se halla superenrollado negativamente (183). Este último estado conformacional hace más accesible al DNA a los agentes que reconocen DNA de simple cadena, como así también favorece la exposición de las secuencias palindrómicas con estructuras cruciformes (50).

Como prototipo presentaremos a la enzima más conocida de este grupo, la DNA girasa. Está formada por dos subunidades, A y B. El complejo tiene cantidades equimoleculares de ambas (100) y existe en solución como tetrámero  $gyrA_2\ gyrB_2$  (166), tal como se observa en *E. coli*, en *Micrococcus luteus* (72) y en *Bacillus subtilis* (167).

Se han descripto las siguientes actividades:

- a. Superenrollamiento negativo del DNA circular cerrado dependiente de ATP.
- b. Relajación de los supergiros en ausencia de ATP.
- c. Cortes en las dos cadenas de DNA promovidos por ácido oxolínico (oxo) en sitios específicos.
- d. Hidrólisis de ATP DNA dependiente.
- e. Formación y resolución de nudos y encadenados de DNA.

Todos los modelos de acción de la enzima sostienen el pasaje de un segmento de DNA a través de la doble cadena rota, generalmente utilizando sitios específicos (14, 90, 101, 35). Los modelos difieren en el mecanismo de transferencia de la cadena, y en particular en cómo la reacción de superenrollamiento asegura una correcta polaridad. Esquematizaremos

brevemente uno de éstos, el de Mizzuchi y Mizzuchi (101) y sus diferencias con los otros (Figura 1).

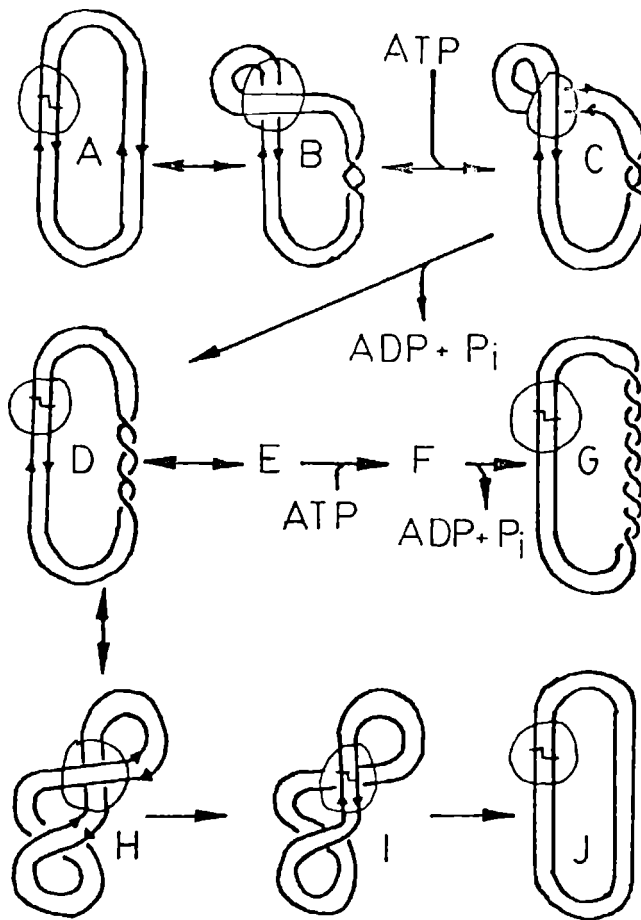
Los sitios específicos (secuencias palindrómicas) en que Oxo promueve el corte de la cadena son también los sitios de unión de la enzima en la reacción de superenrollamiento. Eso sugiere que los segmentos de DNA que son trasladados a través del corte se encuentran cercanos o dentro de una limitada región de 140 pb protegida del ataque por nucleasas, y son enrollados sobre la enzima (86). Es ese enrollamiento el que provee directamente la reacción de superenrollamiento.

La unión con ATP le produce un cambio conformacional a la enzima y conduce, en la operación acoplada, al transporte de los segmentos "protegidos" a través de la cadena rota y posterior reunión del corte (Fig. 1C) disminuyendo el número de eslabones (número de veces que una cadena de DNA se enrolla alrededor del eje de la hélice cuando el círculo es forzado a yacer sobre un plano).

La DNA girasa también puede disminuir el número de eslabones formando cadenas o nudos de DNA, por yuxtaposición de éstas.

En este modelo, la relajación del DNA superenrollado negativamente requiere que los segmentos de DNA puedan ser reunidos en el sentido opuesto al del supergiro (Fig. 1H, I y J). Esta operación ha sido llamada por Brown y Cozzarelli (14) "inversión de signo". En el mecanismo propuesto por estos últimos autores en un primer paso la enzima se une al DNA en 2 sitios e introduce supergiros positivos, un subsecuente pasaje de uno de los 2 brazos de ese lazo a través de una rotura transitoria de la doble cadena "invierte el signo" de los giros, reduciendo el número de eslabones por dos.

Figura 1



Modelo por el cual la DNA girasa puede superenrollar al DNA.

(A) La enzima se une preferiblemente a ciertos sitios del DNA e induce supergiros positivos en una región retorcida (B). El ATP se une a la enzima dirigiendo el transporte de la doble hélice a través del corte y posterior reunión (C), con el consiguiente cambio conformacional de la enzima.

Posteriormente se hidroliza el ATP y se libera el segmento de DNA transportado preparándose el sistema para otro nuevo ciclo de superenrollamiento (D-G). Durante la relajación de los supergiros negativos se produce un lazo "loop" con la otra cadena en que se halla la enzima (H). El transporte de esta cadena de DNA a través de un corte y la posterior reunión del mismo incrementa el número de eslabonado (relajación) por dos unidades (I-J). Extraído de Gellert (52).



Un tercer modelo (90, 184) propone que los supergiros positivos que se presentan alrededor de la enzima no cambian de signo durante la reacción, sino que una nueva molécula de ATP o un segundo enrollado (lazo) de DNA, desde afuera hacia adentro a través de un corte transitorio en la doble cadena, produce un cambio en las unidades de eslabonamiento por dos y un DNA superenrollado negativamente.

Estas enzimas pueden participar en los procesos celulares por dos caminos: indirectamente a través de su efecto en el control del estado superhelicoidal del DNA, o directamente por su participación en procesos que requieren rotura y reunión de DNA (por ejemplo, recombinación).

Es conocido desde hace algún tiempo que es mejor transcripto el DNA superenrollado que el lineal (183) o que el complejo DNA-RNA pol es más estable y presenta mayores sitios de unión (al menos en el fago PM2) cuando el DNA está superenrollado (139).

En el fago N4 se ha observado una estrecha conexión entre la transcripción y el estado topológico del DNA, ya que la transcripción es abolida por la presencia de ácido nalidíxico o en mutantes de temperatura de gyrA (34).

Además de estar estrechamente involucrado en replicación y transcripción, este grupo de enzimas es necesario para la recombinación integrativa del fago lambda (106). Sólo uno de los sitios de unión, el att P, necesita ser superenrollado para que se produzca la integración, lo que no sucede con el att B (107).

Raina y Ravin (132) presentaron evidencias de que en ausencia de superenrollamiento se estimulaba la reparación del daño producido por la radiación ultravioleta. Witkin y Wermundsen (190) demostraron que el ácido nalidíxico (Nal) inducía al

sistema SOS de reparación. Recientemente (63) se ha demostrado que la DNA girasa no está directamente involucrada en esta inducción y Ryan (148) había demostrado que al incubar DNA de *E. coli* con inhibidores de la DNA girasa, Nal le producía cortes al DNA, hecho no observado con novobiocina. A la luz de los conocimientos actuales podemos decir que Nal de algún modo estimula la formación del complejo enzima-DNA y frena la actividad de reunión dejando activa la de corte. Estos cortes, como cualquier otro, inducen a la proteína *recA* y ésta a todo el sistema de reparación SOS (116).

## II. EL BACTERIOFAGO SP01

El bacteriofago SP01, aislado por Okubo y col. (113), es un bacteriofago lítico, grande, de simetría icosaédrica y con elaborada placa basal (178). La cabeza del virión contiene 145 Kilopares de bases (Kpb) de DNA de doble cadena, con un peso molecular aproximado de 100 megadaltons (169). Su composición de bases es poco frecuente, dado que la timina se encuentra totalmente reemplazada por 5-hidroximetiluracilo (hmU). Dicha característica ha permitido agruparlo junto con varios fagos estrechamente vinculados, tales como Øe y SP82 (79), que infectan y lisan a *Bacillus subtilis*.

A partir de SP01 se han aislado más de 120 mutantes letales condicionales de tipo supresible (115). Estos mutantes han sido clasificados mediante experimentos de complementación (9) en 36 cistrones diferentes y con ellos se ha construido un mapa genético mediante cruza de dos y tres puntos. Okubo y col. (115) no pudieron ubicar en el mapa genético a los mutantes de los cistrones 35 y 36, ya que presentaban alta frecuencia de recombinación con cualquiera de los representantes de los otros genes, por lo que podrían ser ubicados en uno o ambos extremos del mapa lineal. Más tarde se sugirió que esta falta de unión al mapa efectivamente podría ser atribuida, como en el fago T5, a una redundancia terminal. Gregg y Stewart (57) demostraron la existencia de una redundancia terminal de 12,6 Kpb donde ubicaron a los cistrones 35 y 36.

Posiblemente diversos grupos de complementación pueden ser subdivididos (cistrones 2, 7, 21, 23 y 30), y hay evidencias de que uno de ellos codifica diferentes

polipéptidos (cistrón 30a y 30c) (136). Estas observaciones indican una posible transcripción policistrónica. Sin embargo, el mapa no está totalmente saturado de mutaciones y por ello es factible suponer la existencia de cistrones no identificados.

Los mutantes han sido clasificados como defectivos en morfogénesis, ensamblado, transcripción y replicación (37, 115, 119). Los mutantes en los cistrones 4 a 20 son defectivos en cabeza, cola o placa basal, los mutantes en los cistrones 1 a 3, 26 y 35 fallan en el ensamblado de los viriones. Además, los mutantes en los cistrones 2, 3, 12, 13 y 14, también presentan anormalidades en la síntesis de DNA.

Mutantes en dos grupos de genes (cistrones 21-23 y 27-32) son absolutamente defectivos en síntesis de DNA viral, y dos de éstos (correspondientes a los cistrones 27 y 28) son, además, defectivos en el programa de transcripción viral medio, como lo son en transcripción viral tardía los mutantes de los cistrones 33 y 34 (36).

Se desconoce el defecto que presentan los mutantes representantes de los cistrones 24 y 25.

#### EFECTOS DE SP01 SOBRE LA CELULA HUESPED

Cuando SP01 infecta a *B. subtilis* 168M el metabolismo bacteriano es profundamente afectado. La replicación de la célula huésped es frenada rápidamente después de la infección (6-8 min p.i.), pero este freno no es atribuible a la degradación del DNA, como sucede con T4 (187). La detención de la síntesis de DNA bacteriano probablemente se deba a

funciones codificadas por el fago que actuarían evitando la formación y utilización de timina por estímulo de la síntesis de hmU.

La síntesis de RNA ribosomal continua después de la infección, pero declina alrededor del inicio de la replicación viral (19). La síntesis de proteínas está fuertemente disminuída, pero algunas proteínas bacterianas continúan sintetizándose durante todo el ciclo infectivo (79).

El período de eclipse del fago en esta cepa es de alrededor de 25 a 30 minutos post-infección (25-30 min p.i.) y el período de latencia, o tiempo de lisis, es de 55 a 60 min p.i., con significativas variaciones dependientes de la densidad celular, de la multiplicidad de infección (m.i.), etc. (119; resultados no presentados).

El hecho de que el bacteriofago silvestre inhiba total o parcialmente muchas funciones celulares implica la existencia de un sistema regulatorio entre el mecanismo sintético de *B. subtilis* y del fago.

A lo largo del presente trabajo se realizan ocasionales comparaciones entre SP01 y otros bacteriofagos, en particular T4. Esas referencias a T4 tienen el propósito de establecer diferencias o similitudes entre SP01 y un bacteriofago ampliamente conocido.

## RASGOS GENERALES SOBRE EL DESARROLLO VIRAL

### a) Síntesis de RNAs virales

La expresión del genoma del bacteriofago SP01 produce una compleja secuencia temporal de RNAs virales (42, 43). Si bien SP01 ha sido menos estudiado que T4 se ha podido establecer inequívocamente que el genoma viral

puede dirigir su propia expresión, modificando apropiadamente la dotación enzimática celular.

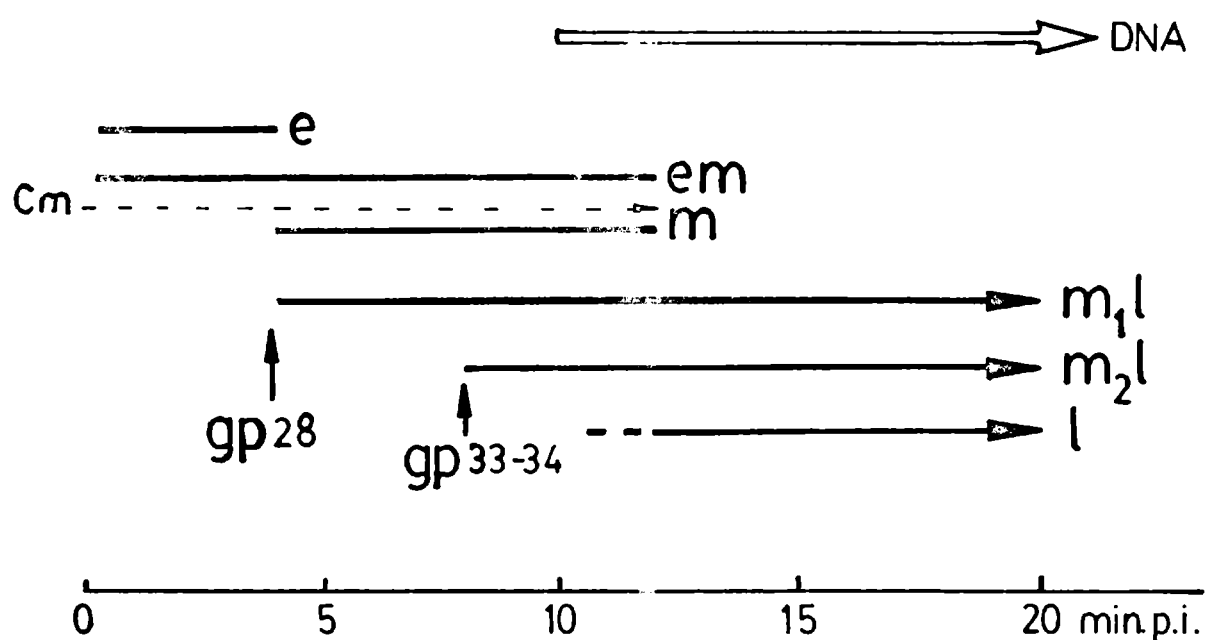
Los estudios sobre la síntesis de RNAs en *B. subtilis* infectado con SP01 se realizaron utilizando técnicas de hibridización de mRNAs a DNA viral, con o sin competición de otros RNAs (39). De estos estudios se han distinguido tres grupos mayoritarios de RNAs: tempranos, medios y tardíos.

La expresión de los genes tempranos comienza dentro del primer minuto post-infección y es frenada a distintos tiempos. Aquéllos que son frenados entre los 3 a 4 min p.i. se denominan RNAs de clase "e", y los que continúan transcribiéndose hasta cerca del inicio de la replicación se llaman RNAs de clase "em" (Cuadro 1). Ambas clases son sintetizadas "in vivo" aún en condiciones en que la síntesis de proteínas ha sido inhibida por el agregado de cloranfenicol (Cm) (40). Evidentemente, la síntesis de los mRNAs de las clases tempranas no requieren de la expresión viral. Se ha demostrado que para transcribir estos RNAs "in vitro" se requiere que sólo interactue con el DNA viral la RNA pol de la célula huésped (29, 30).

Posteriormente, la transcripción viral es controlada positivamente por proteínas sintetizadas durante el ciclo de infección. En particular, las clases medias dependen de la traducción del producto del gen 28 (gp28) (56) y de la integridad del gen 27 (presente trabajo).

Los genes medios comienzan a ser transcriptos después de los 4 min p.i.. La clase "m" es frenada cerca del inicio de la replicación viral y la clase "m<sub>1</sub>l" continua siendo sintetizada hasta el final del ciclo viral (42, 43, 29, 30) (Cuadro 1).

Cuadro 1



Las barras horizontales representan la síntesis de las distintas clases de mRNAs virales. La escala de tiempo se inició con la infección en *B. subtilis* 168M a 37°C.

Las flechas indican el momento en que es requerido un producto X.

En presencia de cloranfenicol (Cm) se sintetizan las clases "e" y "em"; en esas condiciones la clase "e" continúa su síntesis hasta después de los 20 p.i.

.

La tercera clase de RNAs, tardíos, y dependientes de gp33 y gp34, son llamados " $m_2l$ " y "l", de acuerdo al tiempo de aparición. La especie " $m_2l$ " comienza a ser transcripta unos minutos antes o al tiempo en que comienza la replicación, y la especie "l" aparece unos minutos después (36, 121, 122, 172) (Cuadro 1).

#### b) Síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas en el sistema SPO1-*B. subtilis* refleja el esquema secuencial de transcripción antes presentado (119).

Si bien hay numerosos trabajos publicados sobre el tema, sus resultados se ven afectados por diferentes causas:

1. La síntesis residual de proteínas bacteriana limita la resolución y enmascara a las proteínas virales (y, como veremos más adelante, los métodos para eliminar dichas proteínas introducen sus propias complicaciones).
2. La resolución de las proteínas virales es escasa, ya que sólo se usaron geles de una dimensión (136).
3. Los métodos para resolver a los distintos mRNAs son bastante limitados, por consiguiente la traducción mRNAs  $\longrightarrow$  proteínas "in vitro" no es precisa. Para ello se hace necesario conocer la eficiencia de traducción, la vida media del mensajero, etc. Por otro lado, Dawnord y Whiteley (26a) han demostrado que los mRNAs son procesados post transcripción.

Los métodos más comunmente utilizados incluyen: infección en "minicells" (células anucleadas), las cuales sólo traducen las proteínas codificadas por el fago (134), o irradiación celular con luz ultravioleta previa a la infección (61). Ninguno de estos métodos permite la producción de



progenie y a la vez distorsionan la expresión genética.

Mertens y col. (97) han descripto pérdidas en la fidelidad regulatoria cuando se usaban "minicells". Pero aún así, de los resultados publicados se puede obtener una semblanza de la secuencia de síntesis de proteínas virales durante el ciclo lítico, y del peso molecular de estas proteínas. Cuando se infectaron "minicells" con el fago silvestre o con mutantes, se ha logrado observar una secuencia de la expresión genética y se identificaron proteínas tempranas, medias y tardías (136). Sin embargo, por los resultados que presentaremos, con respecto al acople replicación-transcripción viral tardía, podemos suponer que las proteínas tardías no serían sintetizadas, tanto en "minicells" como en células irradiadas, ya que por ninguno de los dos métodos se observó replicación viral. Se puede estimar el grado de utilización del genoma viral a través de su capacidad de síntesis de proteínas. De ellas se han identificado alrededor de 20 proteínas tempranas; si sumamos sus pesos moleculares vemos que se necesitarían 13,5 Kpb de DNA para codificarlas. En el mismo trabajo se han hallado 19 proteínas de clases medias, lo que implicaría 26,2 Kpb. Heintz y Shub (61), por irradiación ultravioleta, han logrado resolver 16 proteínas tardías (19 Kpb de DNA). Sin embargo, por otro camino independiente, Parker (119) ha observado 53 polipéptidos diferentes en el subensamblado del virión, que estarían codificados en 60 Kpb de DNA. Si recordamos que de las 145 Kpb del genoma total, 12,6 Kpb pertenecían a las redundancias terminales, nos encontramos que tenemos 132,4 Kpb de DNA de copia única, y de éste aproximadamente el 46% es dedicado a la construcción del virión. Si sumamos la porción

del genoma utilizado para la síntesis de las proteínas tempranas, medias y subensamblado, podemos suponer que la zona transcripta ocupa casi el 70% del genoma de copia única.

c) Replicación del DNA viral

La síntesis de DNA viral comienza aproximadamente a los 10 min p.i. a 37°C en *B. subtilis* 168M infectado con el bacteriofago silvestre. Este tiempo sería empleado para modular la transcripción en su beneficio y en especial en la preparación del complejo de replicación. Como ya hemos dicho, este fago contiene hmU en lugar de timina, por consiguiente debe sintetizar a las enzimas involucradas en la biosíntesis de este nucleótido (144), así como también una nueva DNA polimerasa (197, 26), y en el presente trabajo presentamos evidencias de que sintetiza un componente de la SP01 DNA topoisomerasa. Se desconoce, en este sistema, quién es el responsable de la síntesis de cebador, como así también la/s proteína/s encargada/s de desestabilizar a la doble cadena de DNA y abrirla. En T4 se ha demostrado que éste sintetiza a su propio cebador (87) y codifica sus propias enzimas desestabilizantes de la doble-hélice, gp32 y la T4 helicasa.

En el bacteriofago SP01, una vez iniciada, la replicación continúa durante todo el ciclo lítico, aunque no se produce inmediatamente DNA maduro, sino que se originan sucesivamente dos formas intermedias, que finalmente dan origen al genoma que será empaquetado (83). El primer intermediario, VF, es un complejo de DNA viral, proteínas y RNAs que sedimenta con velocidad 4 a 6 veces superior al DNA maduro. La segunda forma, F, con una velocidad de sedimentación

tres veces mayor, parece ser un DNA multigenómico, de alto peso molecular (84). Ambos intermediarios parecen contener zonas de DNA de simple cadena.

Recientemente ha sido descripto un modelo concordante con estos datos (163) y que se asemeja bastante (formas VF y F) al modelo de replicación bacteriano (180). Pero en el proceso de maduración del DNA viral se requiere síntesis de proteínas, ya que en su ausencia se acumula la forma VF (84), a diferencia de los sistemas bacterianos (77) en los que una vez iniciada la replicación, hay independencia con la síntesis de proteínas.

De los cistrones conocidos en SP01, nueve de ellos, como ya hemos dicho, son esenciales para la síntesis de DNA (cistrones 21 a 23 y 27 a 32), y los mutantes de estos cistrones presentan fenotipo D0. Hay otro grupo de mutantes que presentan iniciación de replicación retardada (DD) o terminación anticipada (DA), y corresponden a los cistrones 2 a 4 y 11 a 14. Es interesante observar, en éste como en otros sistemas, el agrupamiento de los genes que producen estos determinados fenotipos.

Dentro de los cistrones D0, 27 y 28 intervienen en la regulación de la expresión de los mRNAs de las clases medias (56; presente trabajo), los cistrones 23 y 29 codifican para las enzimas deoxinucleótido quinasa y dUMP hidroximetilasa respectivamente (54); los cistrones 21 y 32 parecen codificar para productos que actúan en la iniciación (53). Pero el último interviene en la terminación de la replicación. Los cistrones 22, 30 y 31 parecen codificar para productos que actúan en la elongación, aunque no se excluye que estén involucrados en la iniciación (53).

El DNA viral sería replicado como un DNA lineal, que luego sería madurado y empaquetado dentro del virión (83).

El cistrón 35, el cual está ubicado en los extremos redundantes en el DNA del virión maduro y aparece no redundante en el DNA superenrollado (46) sugiere que todos los genes pueden ser copia única en un determinado momento. Algo similar ha sido descrito en el fago T7, de *E. coli*. Los cortos extremos redundantes de éste parecen tener un rol importante en el estado topológico de un DNA lineal que está replicándose (186). La enorme fracción redundante de SP01 aparentemente tiene una función similar a la descrita en T7 pero resulta extraño que cumpla sólo ese rol. SP01, parece tener dos orígenes de replicación, desde uno de ellos, vecino al cistrón 32, la replicación es unidireccional, y del otro, próximo al cistrón 2, que parecería sólo replicar a los extremos redundantes, es bidireccional (53).

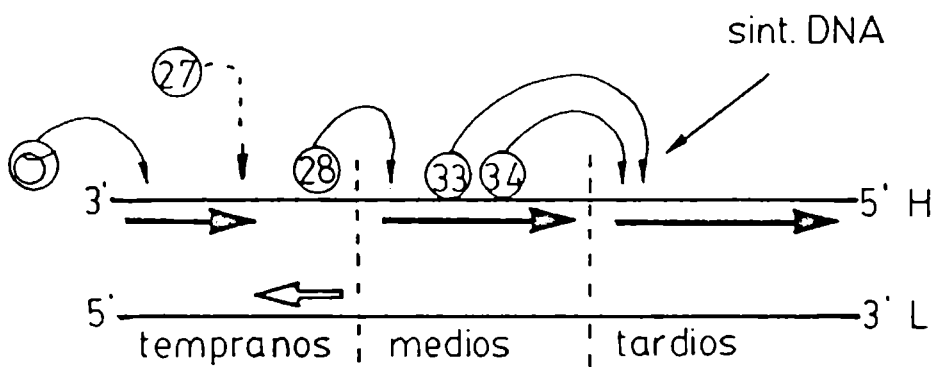
## REGULACION DE LA TRANSCRIPCION

### a) Genes regulatorios

Los productos de cuatro genes regulatorios son necesarios para la síntesis de los RNAs de clases medias y tardías. El gp28 es requerido para la transcripción de las clases "m" y "m<sub>1</sub>l" tanto "in vivo" como "in vitro" empleando como modelo a la cadena pesada (H) (Figura 2). El gp27, como se verá más adelante en este trabajo, sería un control positivo previo a gp28, y los gp33 y gp34 son requeridos para la transcripción de las clases "m<sub>2</sub>l" y "l" (transcriptos también de la cadena H) (Figura 2).

Como hemos dicho anteriormente, los RNAs tempranos

Figura 2



Durante la infección de *B. subtilis* con SP01 sucesivos productos virales modifican el aparato de transcripción de la célula huésped. El núcleo de la RNA pol DNA dirigida de la célula huésped, junto con sigma (del estado vegetativo) transcriben los RNAs de las clases tempranas, el producto del gp28 junto con el núcleo regula la transcripción de las clases medias y los gp33, gp34 y una activa síntesis de DNA regulan y mantienen a la transcripción viral tardía. Se desconoce el rol fisiológico del gp27.

son transcriptos por la RNA pol bacteriana constituida por el "core" ( $\alpha\beta\beta'\delta\omega_1\omega_2$ ) y sigma del ciclo vegetativo. Un extracto crudo de *B. subtilis* infectado con SP01, obtenido a tiempos medios es capaz de jugar un rol regulatorio positivo de la transcripción viral (56). Este hecho ha sido confirmado posteriormente por la purificación de las enzimas responsables de la síntesis de los RNAs medios y tardíos (29, 30, 31, 121, 122, 158, 159). Ambas enzimas están constituidas por el núcleo, "core", de la RNA pol DNA dirigida de la célula huésped y por las proteínas codificadas por el fago (gp28, gp33 y gp34).

Para transcribir "in vitro" sólo son necesarias  $\alpha\beta\beta'$ , no así las otras tres subunidades del "core". Sin embargo, "in vitro" ha sido descrito que  $\delta$  disminuye la síntesis de RNAs antimensajeros (173), incrementa la exactitud de la elección de la cadena a ser transcripta (3) y que es necesario que actúe cooperativamente con gp33 y gp34 para transcribir los RNAs de las clases tardías (174).

Recientemente (80, 171) se ha fabricado una quimera entre un fago lambda defectivo y distintos fragmentos de DNA viral de SP01, en los cuales por resultados previos se conocía la existencia de promotores tempranos, medios y tardíos (170). Los autores transcribieron "in vitro" a esta quimera recuperada después de un ciclo lítico por *E. coli* (la quimera no tiene hmU después del ciclo) o a fragmentos de DNA de SP01 y observaron que la RNA pol bacteriana transcribe a los promotores tempranos de ambos, pero la RNA pol modificada por gp28 o por gp33 y gp34 es incapaz de reconocer a los promotores respectivos de la quimera; o lo hace con muy baja eficiencia. De esta manera, llegaron a la

conclusión de que hmU tiene un rol importante en el reconocimiento de los promotores medios y tardíos.

Willianson y col. (189) habían observado que la subunidad sigma de la RNA pol de *B. subtilis* era la responsable del reconocimiento de la secuencia de bases del promotor. Simpson (157) demostró en *E. coli* que sigma entraba en contacto con una timina en posición -3 (posición +1 es el punto de iniciación), con una secuencia conservada de bases, pribnow box (125) ubicada entre las bases -6 a -12 del promotor y con una región conservada en -35. Lee y col. (80) han observado, en la quimera antes descrita, que el pribnow box era (5'TTTxTT). Salvando el reemplazo de hmU por timina esta misma secuencia fue hallada en los promotores medios de SPO1 (25, 46).

Un hecho similar ha sido descrito para la expresión de la esporulación, donde al dispararse la señal de esporulación, la célula sintetiza otra subunidad sigma, de distinto peso molecular, encargada de reconocer a los promotores del complejo de esporulación (91).

Si analizamos la secuencia de nucleótidos reconocidos por la RNA pol de *B. subtilis* o de *E. coli* en la zona de pribnow box, sería 5' CATAAT y 5' TATAAT respectivamente (80, 81). Esta similitud no debe llamarnos la atención porque la RNA pol de *E. coli* es capaz de transcribir RNAs de clases tempranas de SPO1 aunque con menor eficiencia (81). Quizás la región conservada a -35 sea requerida para dar más especificidad al sistema.

En el fago de *B. subtilis* SP82, con programa de transcripción similar al de SPO1, se ha demostrado que una proteína de 28K es la responsable de modificar a la RNA pol

bacteriana para transcribir a las clases medias (64). Milhausen y Whiteley (98) han encontrado que era necesario acoplar la transcripción-traducción y usar al sistema de *B. subtilis* para obtener esta proteína "in vitro" hecho éste que puede hacernos pensar en un procesamiento post-transcripción. Además, demostraron que el gen que codifica a la proteína de 28K era transcripto en presencia de Cm.

El gp27 también ha mostrado ser requerido para la transcripción media (ver más adelante) y tardía (45; presente trabajo). Okubo y col. (115) han clasificado al gen 27 como involucrado en la replicación, pero veremos que su falla es muy temprana y distinta que la del gen 28.

Geiduschek e Ito (46) postularon que quizás el gp27 tenga un rol dual, como el gp45 de T4, que interactúa con la RNA pol (20) y con gp42 y gp60 del complejo de replicación (87).

#### b) Mapeo de los promotores virales

El genoma del fago SP01 fue digerido con diversas enzimas de restricción (169, 170, 171), y posteriormente estos fragmentos fueron hibridizados por la técnica de Southern (164) a RNAs marcados del fago silvestre y de mutantes regulatorios (mutantes en los cistrones 28, 33 y 34) obtenidos a tiempos conocidos. Sobre estos fragmentos también se midió a cual de ellos se unió la RNA pol bacteriana y sus sucesivas modificaciones (29, 30, 46, 121). De esta manera se pudo saber qué clase de promotores había en cada fragmento analizado, como así también se pudo conocer que existía un alto nivel de transcripción en limitadas secciones del genoma, mientras que en el resto era muy escasa. Como ejemplo



podemos citar que la transcripción temprana, casi en su totalidad, es copia de los extremos redundantes y escasa en otras regiones.

c) Detención de la síntesis de las distintas clases de RNAs

Los RNAs de las clases "e" y "em" son frenados a distintos tiempos después de la infección de *B. subtilis* 168M con el fago silvestre. El mecanismo de este freno no está totalmente comprendido pero Rabussay y Geiduschek (129) sugirieron que los RNAs de las clases "e" dejarían de ser transcriptos después de la modificación de la RNA pol por gp28 y en el presente trabajo se presentan evidencias de que además sería necesario un cierto estado topológico del DNA para tal freno. Los RNAs de las clases "em" y "m" parecerían ser bloqueados por el inicio de la replicación o por una nueva modificación de la RNA pol por los gp33-34 (174). Sin embargo, en un mutante DO (HA20) con un programa de transcripción fuertemente afectado, hemos observado freno de la clase "em" pero no de "m".

Wilson y Geiduschek (188) han aislado una proteína, TF1, de bacterias infectadas con SP01 que inespecíficamente inhibe "in vitro" la transcripción. Esta proteína une a DNA impidiendo la formación del complejo DNA-RNA pol. La secuencia de aminoácidos de TF1 es parcialmente homóloga con la de la proteína II de *E. coli*, descrita anteriormente (96) y podría ser una proteína específica que se une a DNA (146) dándole un determinado estado conformacional. No es conocido si TF1 reprime la transcripción viral "in vivo".

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S

## I. BACTERIAS Y BACTERIOFAGOS

Las cepas de *B. subtilis* utilizadas fueron:

- a. 168M (15). Esta cepa requiere indol o triptofano, no porta supresor ( $Su^-$ ) y su tiempo de duplicación, en medio CHT líquido a 37°C y con aireación, es de 35 minutos.
- b. HA101A (114). Requiere leucina, metionina, histidina y no porta supresor ( $Su^-$ ). Su tiempo de duplicación, en medio LMH líquido a 37°C y con aireación, es de 36 minutos.
- c. HA101B. Deriva de la cepa anterior. Requiere leucina y porta supresor ( $Su^+$ ), hecho por el cual se corrigieron dos de las mutaciones de la cepa isogénica. Es permisiva para el crecimiento de bacteriofagos mutantes de tipo supresible (mutaciones sin sentido). Su tiempo de duplicación, en medio L líquido a 37°C y con aireación, es de 60 minutos.
- d. JA60B. Deriva de la cepa HA101B pero por mutagénesis química se la hizo resistente a Nal (250 µg/ml). Su tiempo de duplicación en medio L líquido a 39°C y con aireación es de 60 minutos.
- e. JA60A. Deriva de la cepa JA60B a la cual por repetidos pasajes por medio rico se la hizo perder el carácter supresor ( $Su^-$ ). Su tiempo de duplicación en medio LMH líquido a 37°C y con aireación es de 37 minutos.
- f. PB1706 (16). Requiere tirosina, triptofano, ácido siquímico, es resistente a 300 µg/ml de Nal y es ( $Su^-$ ). Su tiempo de duplicación, en medio M1706 líquido a 37°C y con aireación, es de 50 minutos en ausencia de Nal y de 80 minutos en presencia de 150 µg/ml de Nal.

g. QM27 (60). Requiere leucina, metionina, adenina, es resistente a Novo (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y no porta supresor. Su tiempo de duplicación, en medio líquido a 37°C y con aireación, es de 36 minutos tanto en presencia como en ausencia del antibiótico.

En las distintas experiencias fueron utilizados los siguientes bacteriofagos:

SPO1 silvestre (113), mutantes J (presente trabajo) capaces de dar progenie en 200  $\mu\text{g/ml}$  de Nal y los mutantes letales condicionales de tipo supresible (115) deficientes en replicación: O39 (cistrón 21), F30 (cistrón 22), O5 (cistrón 23), HA20 (cistrón 27), F21, O33 y O36 (cistrón 28), F13 y HA21 (cistrón 29), F26 (cistrón 30), HA32 (cistrón 31) y F38 (cistrón 32); y con iniciación retardada o terminación anticipada de la síntesis de DNA: F47 (cistrón 2b), F45 (cistrón 3), F6 (cistrón 4), F31 y HA10 (cistrón 12) y F11 (cistrón 14).

## II. MEDIOS DE CULTIVO

- a. CHT (por litro) 0.076 g de  $\text{MgCl}_2$ ; 0.056 g de  $\text{CaCl}_2$ ; 1.25 g de hidrolizado de caseína; 0.05 g de L-triptofano; 5 g de glucosa y 100 ml de sales de Spizizen diez veces concentrados ( $\text{SS}_{10\text{X}}$ ).
- b. LMH (por litro) 0.076 g de  $\text{MgCl}_2$ ; 0.028 g de  $\text{CaCl}_2$ ; 0.05 g de L-leucina; 0.05 g de L-metionina; 0.05 g de L-histidina; 5 g de glucosa; 5 ml de NB y 100 ml de  $\text{SS}_{10\text{X}}$ .
- c. L (por litro) Su composición es idéntica a la del medio

LMH pero carece de los aminoácidos metionina e histidina.

- d. M1706 (por litro) 0.076 g de  $\text{MgCl}_2$ ; 0.056 g de  $\text{CaCl}_2$ ; 0.025g de hidrolizado de caseína; 0.05 g de L-triptofano; 0.05 g de L-tirosina; 0.05 g de fenilalanina; 5 g de glucosa; 5 ml de NB y 100 ml de  $\text{SS}_{10\text{X}}$ .
- e. M27 (por litro) 0.076 g de  $\text{MgCl}_2$ ; 0.056 g de  $\text{CaCl}_2$ ; 0.05 g de L-leucina; 0.05 g de L-metionina; 0.01 g de adenina; 5 g de glucosa; 5 ml de NB y 100 ml de  $\text{SS}_{10\text{X}}$ .
- f. NB (por litro) 3 g de extracto de carne; 5 g de peptona y 5 g de  $\text{ClNa}$ .

Para preparar cualquiera de los medios indicados anteriormente, en estado sólido, se agregan 15 g de agar por cada litro de medio.

- g. Agar blando (por litro) 7.5 g de agar (Difco) y 8 g de  $\text{ClNa}$ .

### III. SOLUCIONES

- a. Solución de Spizizen ( $\text{SS}_{1\text{X}}$ ): 2 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 6 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 g de citrato de sodio y después de autoclavado se le agregó  $\text{MgCl}_2$  hasta concentración final de  $5 \times 10^{-3}$  M.
- b. Tris.ClH pH 7.5: Buffer Tris.ClH  $10^{-2}$  M pH 7.5 a 20°C.
- c. Tris.Mg (TM): Buffer Tris.ClH  $10^{-1}$  M pH 7.5 a 20°C y  $\text{MgCl}_2$   $5 \times 10^{-3}$  M.
- d. Tris.KCl: Buffer Tris.ClH  $10^{-2}$  M pH 7.5 y KCl 0.5 M
- e. AcNa pH 5.5: Buffer Acético-Acetato de Na 0.1 M pH 5.5 a 20°C.

f. SSC: NaCl 0.15 M; citrato de sodio 0.015 M.

g. RSB: KCl  $10^{-2}$  M;  $MgCl_2$   $5 \times 10^{-3}$  M; Tris.HCl  $10^{-2}$  M pH 7.5 a 20°C.

Todas las drogas utilizadas en la preparación de los distintos medios y soluciones son proanálisis o de grado bacteriológico.

#### IV. COMPUESTOS MARCADOS CON ISOTOPOS RADIOACTIVOS

Adenina(2-<sup>3</sup>H) actividad específica de 23 Ci/mmol. Obtenido de New England Nuclear.

L-leucina(4, 5-<sup>3</sup>H) actividad específica de 160 Ci/mmol. Obtenido de New England Nuclear.

Uridina(5, 6-<sup>3</sup>H) actividad específica de 44 Ci/mmol. Obtenido de New England Nuclear.

#### V. ANTIBIOTICOS

a. Cloranfenicol: obtenido de Parke-Davis. Las soluciones se prepararon, en el medio de cultivo, en el momento de usarlo.

b. Acido nalidíxico (Nal): obtenido de Sigma. Las soluciones se prepararon en KOH  $4 \times 10^{-2}$  M y se conservaron a -20°C.

c. Novobiocina (Novo): obtenida de Upjhon. Las soluciones se prepararon en agua y se conservaron a -20°C.

## VI. DROGAS

N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG) obtenido de Fluka. Las soluciones se prepararon en buffer AcNa 0.1 M pH 5.5, en el momento de usarlas.

## VII. ENZIMAS

- a. Lisozima grado VI, de clara de huevo. Obtenida de Sigma. Enzima libre de sales.
- b. Ribonucleasa: obtenida de Sigma (tipo IX-A, de páncreas bovino). Enzima libre de proteasas. Antes de ser utilizada se inactivó la DNasa contaminante por calentamiento a 90°C durante 5 minutos en Tris.ClH  $10^{-2}$  M pH 7.5.
- c. Deoxirribonucleasa I, extracto crudo de páncreas bovino. Obtenida de Sigma.

## VIII. PREPARACIONES

- a. BACTERIOFAGOS. El bacteriofago silvestre se obtuvo infectando a 168M; J1 infectando a JA60A y PB1706 en presencia de 150 µg/ml de Nal, y los mutantes letales condicionales de tipo supresible infectando a HA101B, en los medios adecuados, a 37°C y a una multiplicidad de infección (m.i.) entre 0.03 y 0.5 bacteriofagos/bacteria. En el caso del fago silvestre las bacterias crecidas en fase logarítmica ( $DO_{500nm} = 0.6$ ;  $0.4 - 1 \times 10^8$  bacterias/ml), en CHT fueron infectadas a m.i. 0.03. Una vez ocurrida la lisis ( $DO_{500nm} = 0.04$  aproximadamente), se eliminaron los restos celulares por centrifugación a

8000 rpm durante 5 minutos (centrífuga Sorvall, rotor GSA). Los títulos obtenidos oscilaron entre 1 y  $5 \times 10^9$  bacteriofagos/ml).

Para experimentos que requerían una buena infectividad se utilizaron lisados purificados hasta esta etapa. Cuando se requería lisados más purificados y concentrados, a la preparación anterior se la centrifugaba durante 90 minutos a 12000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor GSA). El precipitado se dejaba durante toda la noche en Tris-Mg (TM) a 4°C, y luego se resuspendía con pipeta Pasteur (se utilizaron aproximadamente 4 ml de TM por litro de cultivo lisado). El precipitado así resuspendido se centrifugó a baja velocidad (8000 rpm) durante 10 minutos en centrífuga Sorvall rotor SS34. El sobrenadante se purificó finalmente por gradiente de centrifugación discontinuo de CsCl (formado por capas de CsCl de 70%, 60%, 50%, 40%, 30% y 20% de saturación en Tris-ClH 0.1 M pH 7.5) durante 25 minutos a 27000 rpm (ultra centrífuga Spinco L2, rotor 50). La fracción opalescente que contenía los fagos se dializó contra TM. La suspensión así obtenida contenía de 2 a  $4 \times 10^{12}$  partículas capaces de formar placas de lisis por mililitro y entre 12 a 17 unidades de absorbancia a 260nm por mililitro.

#### b. DNA DE SPO1

Se obtuvo a partir de SPO1 silvestre purificado por gradiente de CsCl, de acuerdo al método de Mandell y Hershey (92). A una suspensión de bacteriofagos ( $2$  a  $4 \times 10^{12}$  fagos/ml) se le agregó un volumen igual de



fenol bidestilado, previamente equilibrado a temperatura ambiente con un volumen igual de Tris base 0.1 M y NaCl 0.1 M. Luego de cada extracción fenólica, realizada a temperatura ambiente, las fases se separaron por centrifugación durante 10 minutos a 8000 rpm en centrifuga Sorvall, rotor SS34. Después de realizar al menos cuatro extracciones (hasta la desaparición de la película en la interfase fenol-agua), la preparación (fase acuosa) se dializó contra NaCl 1 M Tris-ClH  $10^{-2}$  M pH 7.5 y contra Tris-ClH  $10^{-2}$  M pH 7.5. La diálisis se realizó a 4°C y los pasos se repitieron una vez más. Previo a su almacenado a 4°C el volumen total se fragmentó (pasándolo por jeringa, con aguja 35 x 0.5, a presión) y se le determinó la concentración de DNA espectrofotométricamente a 260nm ( $E_{260nm} = 2.0 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ ), utilizando un espectrofotómetro Beckman DU modelo G-2400. Las soluciones de DNA se consideraron suficientemente libres de proteínas y fenol cuando cumplían la condición  $A_{260}/A_{280} = 2$ . Los rendimientos oscilaron entre 0.3 y 0.5 µg de DNA por litro de cultivo lisado original, y con un tamaño que oscila entre 3 a 10 Kpb. Tamaño éste determinado por su migración relativa en un gel de agarosa al 0.7 % (resultados no mostrados).

#### c. RNA

##### RNAs marcados

Para preparar los  $^3\text{H}$ RNAs marcados por pulsos se infectaron bacterias en fase logarítmica de crecimiento ( $DO_{500nm} = 0.6$ ) con el fago en cuestión a m.i. 10. A

distintos tiempos después de la infección se agregó al cultivo uridina tritiada hasta alcanzar la actividad y concentración que se indican en cada caso. Al cabo de 2 o 3 minutos se detuvo la incorporación enfriando el cultivo con la mitad de su volumen de SS-Mg 1X congelado con  $\text{NaN}_3$   $10^{-2}$  M. Una vez fría, la suspensión de células infectadas se centrifugó durante 10 minutos a 8000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor SS34). El sedimento se resuspendió en RSB- $\text{NaN}_3$   $10^{-2}$  M, empleando un volumen de 0.1 ml por mililitro de cultivo original. Se agregó lisozima hasta concentración final de 300  $\mu\text{g/ml}$  y la suspensión se congeló sumergiéndola en etanol a  $-80^\circ\text{C}$  y se calentó a  $37^\circ\text{C}$  hasta descongelamiento. Se repitió el congelamiento y calentamiento, continuando este último hasta que comenzó la lisis celular (habitualmente después de haber transcurrido 1 - 2 minutos, desde el descongelamiento). En ese momento, se agregó dodecil sulfato de sodio al 1% y NaAc pH 5.5 hasta  $10^{-1}$  M y seguidamente fenol bidestilado en una relación 2:1; éste previamente se equilibró con un volumen igual de agua. Durante cada extracción la temperatura se mantuvo a  $70^\circ\text{C}$ , seguida de un rápido enfriamiento a  $5^\circ\text{C}$ . Posteriormente se centrifugaron durante 20 minutos a 3000 rpm (centrífuga Crhist). Se realizaron extracciones hasta la desaparición de la película en la interfase. Luego la preparación de RNA se dializó contra NaCl 1 M Tris ClH  $10^{-2}$  M pH 7.5 y luego contra Tris-ClH  $10^{-2}$  M pH 7.5. Este paso fue repetido por dos veces. El RNA obtenido se mantuvo congelado a  $-80^\circ\text{C}$ .

### RNAs competidores

Para su preparación se sigue, en líneas generales, los pasos detallados en el procedimiento anterior. Las diferencias se mencionan a continuación.

El cultivo se lo infectó con SPO1(+) a m.i. 10 y al momento que se lo deseó extraer al RNA, se lo enfrió (como en el paso anterior) y se lo centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor GSA). El precipitado se resuspendió en RSB frío. En el caso en que el cultivo fuera infectado por más de 10 minutos se resuspendió en 20 ml por litro de cultivo; a tiempos menores se resuspendió en la mitad de volumen.

Una vez realizadas las extracciones fenólicas, a la fase acuosa se le agregó NaCl 1 M y se precipitó con 2,3 volúmenes de etanol 96% a -80°C. Después de una noche a -20°C la preparación de RNA se centrifugó durante 10 minutos a 8000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor SS34).

Se lavó dos veces con etanol 70% - Tris ClH  $10^{-2}$  M pH 7.5 30% y una vez con Tris ClH  $10^{-2}$  M pH 7.5 y se redisolvió con varilla de vidrio, en una cantidad apropiada de Tris ClH  $10^{-2}$  M pH 7.5. El RNA obtenido se congeló a -20°C. Para obtener el RNA(+) Cm 12 min, al momento de la infección se agregó 100 µg/ml de cloranfenicol.

La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente mediante la determinación de absorbancia a 260nm ( $E_{260nm} = 2.3 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ ). Las soluciones de RNAs se consideraron suficientemente libres de proteínas y fenol cuando cumplían la condición  $A_{260}/A_{280} = 2$ . Los rendimientos oscilaron, para los RNAs marcados,

entre 0.02 - 0.01 mg y las incorporaciones entre  $2 \times 10^5$  a  $2 \times 10^6$  cpm/ml de cultivo, y para los RNAs no marcados entre 8 a 10 mg/litro de cultivo.

Tanto para DNA como para RNA se realizaron espectros en la región ultravioleta, desde 220 a 310nm y sus resultados son similares a los obtenidos en bibliografía (92).

## IX. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### a. AISLACION DE MUTANTES

#### Bacteriofagos mutantes

Los bacteriofagos J resistentes a 200  $\mu\text{g/ml}$  de Nal, fueron aislados en el presente trabajo por dos caminos independientes.

1. Se infectó a *B. subtilis* PB1706 en fase logarítmica de crecimiento ( $\text{DO}_{500} = 0.05$ ;  $0.250 = 1 \times 10^8$  bact/ml), con un clon de fagos, una placa de lisis, del bacteriofago silvestre (se hicieron en paralelo 10 infecciones similares) a m.i. 1. Al momento de la infección se agregó al medio 30  $\mu\text{g/ml}$  de NG. A los 120 minutos post infección (p.i.) el cultivo fue titulado. Posteriormente las placas de lisis obtenidas fueron picadas en ausencia y presencia de 200  $\mu\text{g/ml}$  de Nal. Como la totalidad de las placas, por picado, son capaces de desarrollar en Nal, las de mayor tamaño fueron resuspendidas y tituladas en presencia y ausencia del inhibidor. Se consideró resistente a aquel fago que su eficiencia de plaqueo en presencia de 200  $\mu\text{g/ml}$  de Nal resultó superior al 70%.

2. Se infectó a PB1706 creciendo en fase logarítmica ( $DO_{500} = 0.3$ ) a m.i. 10 con el bacteriofago silvestre. Al momento de la infección se agregó 30  $\mu\text{g/ml}$  de NG. Una vez producida la lisis se tituló al cultivo en presencia y en ausencia de 150  $\mu\text{g/ml}$  de Nal. Las placas de lisis obtenidas en la caja con Nal fueron picadas a dos concentraciones del antibiótico (200 y 250  $\mu\text{g/ml}$ ) y en ausencia de éste. Se usó la misma eficiencia de plaqueo para considerar la resistencia.

Por ambos caminos el porcentaje de supervivencia con respecto al título habitual, en ausencia de mutágeno, es del orden del 10%. La diferencia entre ambos métodos es que por el primer camino nos aseguramos que las mutaciones sean independientes (por las diferentes infecciones) en cambio al usar una población viral nos encontramos con el inconveniente que podríamos aislar reiteradamente mutaciones espontáneas presentes en el stock inicial.

#### Bacterias mutantes

Las cepas de *B. subtilis* JA60A y JA60B fueron aisladas mediante mutagénesis química. Para ello se creció a *B. subtilis* HA101B ( $\text{Leu}^-$ ,  $\text{nal}^S$ ,  $\text{Su}^+$ ) hasta  $2 \times 10^8$  bacterias/ml (25 ml), luego se los centrifugó, por dos veces, a 8000 rpm durante 10 minutos (centrífuga Sorvall, rotor SS34), resuspendiéndolo en buffer de citrato 0.1 M pH 5.5 la primera y la segunda vez en medio mínimo en presencia de 30  $\mu\text{g/ml}$  de NG. El cultivo con el

mutágeno se incubó durante 40 minutos a 37°C y con aireación. Una vez cumplido el tiempo se lavó (por centrifugación) la NG y se sembró en cajas de Petri, con medio mínimo, en presencia de 100 µg/ml de Nal, o en ausencia de éste.

De los distintos procesos de mutagénesis se obtuvieron 64 colonias capaces de crecer en 150 µg/ml de Nal a diferencia del control (sin mutágeno) que eran incapaces de hacerlo. Las bacterias, en el ciclo de mutagénesis, no tuvieron posibilidades de duplicarse hecho éste que nos hizo suponer que derivaban de eventos independientes. Además, en las cajas de Petri usadas para visualizar las colonias, la concentración de mutágeno (llevado por arrastre) era despreciable, menor de  $10^{-4}$  µg/ml.

#### b. ENSAYOS EN PLACA

##### Bacterias viables

Para determinar el número de bacterias viables se extendieron 0.05 a 0.1 ml de una dilución apropiada de bacterias en SS<sub>1X</sub> sobre una caja de Petri con medio sólido apropiado. Las colonias pudieron ser contadas al cabo de 12 horas (sin antibiótico) o de 24 a 48 horas (en presencia de antibióticos) a 37°C. Las bacterias sobrevivientes se visualizaron del mismo modo.

##### Título de un lisado

El título de un lisado (número de unidades formadoras de placa por mililitro) se determinó de la siguiente manera: se preparó una dilución apropiada del lisado (en SS<sub>1X</sub>) del cual se tomó 0.05 a 0.1 ml y se mezcló

con 0.3 a 0.5 ml de bacterias indicadoras (aproximadamente  $1 \times 10^8$  bacterias) y 3.0 ml de agar blando (fundido y mantenido a 45°C). Esta mezcla se agitó y extendió sobre una caja de Petri con medio sólido apropiado. Al cabo de 12 a 48 horas de incubación a 37°C se pudieron encontrar placas de lisis.

#### Centros infectados

Esta determinación incluye a los centros infectados y a los bacteriofagos libres. Para realizarla se mezcló 0.05 a 0.1 ml de una dilución apropiada, en SS<sub>1X</sub>, de células infectadas con 0.3 a 0.5 ml de bacterias indicadoras en 3 ml de agar blando. Dicha mezcla se extendió sobre cajas de Petri sobre medio sólido adecuado. Para cuantificar los centros infectados se esperaron los tiempos antes indicados.

#### Fagos libres (no adsorbidos)

Una alícuota del cultivo infectado se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm (centrífuga Sorvall, rotor SS34) ó 1.4 minutos en centrífuga Microfuga Beckman de mesa, para sedimentar las bacterias infectadas. Una dilución adecuada del sobrenadante se sembró de la manera indicada en el punto anterior.

#### Bacterias indicadoras

Un cultivo de toda la noche se diluyó unas 50 veces en medio fresco y se mantuvo a 37°C con agitación y aireación hasta  $DO_{500nm} = 1.0$ . De esta manera se logró un

cultivo con alrededor de  $3 \times 10^8$  bacterias/ml, en fase logarítmica de crecimiento, de modo que 0.3 a 0.5 ml del mismo eran suficientes para formar una capa continua sobre una caja de Petri.

c) COMPLEMENTACION

En medio sólido

Las complementaciones se realizaron agregando  $10^4$ - $10^5$  bacteriofagos en forma sobrepuesta sobre una caja de Petri que contenía un césped de bacterias apropiadas. El número de bacteriofagos era el máximo posible que no producía placas debidas a revertantes.

Los ensayos se llevaron a cabo en bacterias  $Su^-$ , condición no permisiva para el par a complementar.

La complementación se consideró positiva cuando se observó halo de lisis donde se agregaron superpuestos los dos bacteriofagos mutantes a complementar y no se observó lisis cuando se agregaron cada uno de ellos por separado. Se la consideró negativa cuando no se observó placa de lisis en ninguna de las tres situaciones (el par y cada uno de ellos por separado). Además, se realizó un control positivo sobre bacterias  $Su^+$  en condiciones permisivas.

En líquido

Se infectó con el par de fagos a complementar a *B.*

*subtilis* 168M creciendo en fase logarítmica ( $DO_{500nm} = 0.5$ ;  $0.4 = 1 \times 10^8$  bacterias/ml) a m.i. 10. A los 10 minutos p.i. el cultivo se diluyó 100 veces y se midieron fagos libres, bacterias sobrevivientes y centros



infectados. A los 120 minutos p.i. se agregó 10 µg/ml de lisozima para completar la lisis y tituló sobre bacterias no supresoras

El rendimiento del par complementado se obtuvo a partir del título del lisado en  $Su^+$  sobre los centros infectados, y de los controles del título en  $Su^+$  sobre las bacterias infectadas.

d) RETROCRUZA

Bacterias HA101B, en fase logarítmica de crecimiento ( $DO_{500nm} = 0.5$ ;  $0.4 = 1 \times 10^8$  bacterias/ml) se infectaron en medio L (líquido) con fagos silvestre y mutante HA20, en forma conjunta y a m.i. 10. Luego de producida la lisis, la suspensión se tituló sobre bacterias  $Su^+$ . Posteriormente las placas de lisis se transfirieron por picada a cajas de Petri que contenían bacterias  $Su^+$  y  $Su^-$ . Las placas complementarias de las que no desarrollaron en  $Su^-$  fueron complementadas con HA20 para asegurarnos que fuese esa la mutación segregada. El procedimiento se repitió por dos veces.

e) SINTESIS DE DNA

La síntesis de DNA se midió a través de la incorporación de adenina tritiada en material álcali estable y precipitable por ácido tricloroacético (TCA).

Se infectaron bacterias en fase logarítmica de crecimiento ( $1.2 \times 10^8$  bacterias/ml) con el bacteriofago que en cada caso se indica, a m.i. 10.

A los tiempos indicados en cada caso se agregó la marca hasta las concentraciones y cantidades que se

consignan (ver leyendas de las figuras en cuestión). A distintos tiempos se tomaron muestras de 0.2 ml, que se agregaron a 0.4 ml de KOH 1 M y fueron incubadas durante 3 horas a 45°C. Transcurrido dicho tiempo, las muestras se precipitaron con TCA 5% en frío (concentración final). Los precipitados fueron recogidos sobre filtros de nitrocelulosa, lavados tres veces con TCA 5% (10 ml aproximadamente por vez) y luego con 0.3 a 0.6 ml de etanol/agua (70/30). Los filtros se secaron y contaron con tolueno-omnifluor (New England Nuclear; 4 g/l) en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb. La adquisición, manejo y descarte de material radioactivo se realizó según las reglamentaciones de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

f) SINTESIS DE RNA

La síntesis de RNA total se midió a través de la incorporación de adenina tritiada en material álcali lábil y precipitable por TCA.

La infección y agregado de precursores se realizaron como en el paso anterior (síntesis de DNA).

A distintos tiempos se tomaron muestras de 0.2 ml, que fueron agregadas a 0.4 ml de KOH 1 M. Inmediatamente después se agregó TCA 5% (frío) a una parte de la muestra y el precipitado se recogió, lavó y contó como para el caso de síntesis de DNA.

La incorporación a RNA resultó de restar de la total (previa a la hidrólisis alcalina) la incorporación en DNA (post hidrólisis), multiplicadas ambas por los factores apropiados para su expresión en cpm/0.2 ml.

g) SINTESIS DE PROTEINAS

La síntesis de proteínas se midió a través de la incorporación de leucina tritiada en material TCA precipitable.

Se infectaron bacterias en fase logarítmica de crecimiento ( $DO_{500nm} = 0.5$ ;  $0.4 = 1 \times 10^8$  bacterias/ml) con el bacteriofago silvestre en las condiciones que se indican en las leyendas, o directamente se partió de esa concentración de bacterias cuando se quería medir bacterias sin infectar.

A distintos tiempos se tomaron muestras de 0.2 ml que fueron precipitadas con 1 ml de TCA 5% (en frío). El precipitado se recogió, lavó y contó como para los casos de síntesis de RNA y DNA.

h) ENSAYO DE HIBRIDIZACION-COMPETICION

Se realizó según el método de Nygaard y Hall (109). Se Incubó  $^3H$ RNA (0.2 a 0.4  $\mu g/ml$ ) y un exceso de DNA (10-15  $\mu g/ml$ ) de SPO1 (desnaturalizado por calentamiento durante 10 minutos a  $100^\circ C$  en Tris-ClH  $10^{-2}$  M pH 7.5) en  $SSC_{X2}$ , en presencia o no de RNAs competidores, durante tres horas a  $70^\circ C$  en un volumen final de 0.2 ml. Finalizada la incubación se agregó ribonucleasa (libre de deoxirribonucleasa) hasta concentración final de 12.5  $\mu g/ml$  durante 15 minutos a  $37^\circ C$ .

Los híbridos se recogieron sobre filtros de nitrocelulosa, se lavaron tres veces con Tris-KCl (10 ml por lavado aproximadamente) y una vez con 0.5 ml de etanol-agua (70/30)

## R E S U L T A D O S

## C A P I T U L O   I

## ACCION DE INHIBIDORES DE LA REPLICACION SOBRE EL DESARROLLO DEL BACTERIOFAGO SPO1 EN DIFERENTES CEPAS DE *B. subtilis*

Para estudiar la transcripción tardía durante el desarrollo del fago SPO1, en condiciones de síntesis de DNA inhibida, se analizó el efecto de varios inhibidores sobre distintas cepas bacterianas y sobre el desarrollo de SPO1 silvestre.

Se procuró elegir un inhibidor que no bloqueara la síntesis de DNA interactuando directamente con él, sino que afectara una función específica del complejo de replicación. Los más conocidos en *B. subtilis* son: 6-hidroxifenil azouracilo (HPUra), ácido nalidíxico y novobiocina. El HPUra inhibe la actividad de la DNA polimerasa (DNA pol) bacteriana, pero no tiene efecto sobre la DNA pol codificada por el fago (198) ni afecta el desarrollo de SPO1 (16). Acido nalidíxico (Nal), ácido oxolínico (Oxo), coumermicina (Cou) y novobiocina (Novo) bloquean la síntesis de DNA en *B. subtilis* a través de la inhibición que ejercen sobre la DNA girasa bacteriana (167). Estos antibióticos, tanto en *B. subtilis* como en *E. coli*, inhiben independientemente a una de las dos subunidades de la DNA girasa. Nal y Oxo, cuyo blanco de acción es la subunidad A, inhiben la función de corte y reunión en sitios específicos (48). Novo y Cou, cuyo blanco de acción es la subunidad B, inhiben la función topoisomerasica propiamente dicha dependiente de ATP (47). En este trabajo se analizarán los efectos de Nal y Novo.

a) EFECTOS DE Nal Y Novo SOBRE EL DESARROLLO DE SPO1 EN DISTINTAS CEPAS DE *B. subtilis*.

Infectando a *B. subtilis* 168M (nal<sup>S</sup>, nov<sup>S</sup>) con el fago silvestre a m.i. 10, observamos que la lisis se producía aproximadamente a los 54 minutos p.i., con un rendimiento de casi 30 fagos por bacteria infectada (Tabla 1).

Previo al uso de estos inhibidores sabíamos que 50 µg/ml de Nal inhibían a *B. subtilis* 168M (41) y que 150 µg/ml inhibían al bacteriofago SPO1, si el antibiótico era agregado poco después de la infección (150). Se procuró encontrar la dosis de Novo que inhibiese la replicación bacteriana (resultados mostrados en el Capítulo II). Una vez hallada ésta, medimos la sensibilidad del fago al inhibidor a dosis mayores y menores a la que inhibía a la bacteria. Como se puede observar en la figura 3, 5 µg/ml de Novo inhiben un 99% del desarrollo viral, dosis ésta igual a la que inhibe el desarrollo bacteriano (resultados no mostrados). Además, observamos que si agregamos los inhibidores una vez iniciada la síntesis de DNA viral, el sistema se hace menos sensible al inhibidor (resultados no mostrados).

Cuando a un cultivo de *B. subtilis* 168M infectado con SPO1 silvestre le agregamos Nal (150 µg/ml) o Novo (5 µg/ml) observamos un retardo en el tiempo de lisis de 200 minutos para Nal y 260 minutos para Novo (Tabla 1). En esas mismas condiciones la producción de fagos se ve seriamente afectada (93% y 99%, respectivamente).

Con el objeto de conocer el grado de participación de la DNA girasa celular en el desarrollo del fago SPO1 silvestre se emplearon las cepas QM27 (nov<sup>r</sup>) resistente a

Tabla 1

Efectos de Nal y Novo sobre el desarrollo de SP01 en *B. subtilis* 168M, QM27, PB1706 y JA60A.

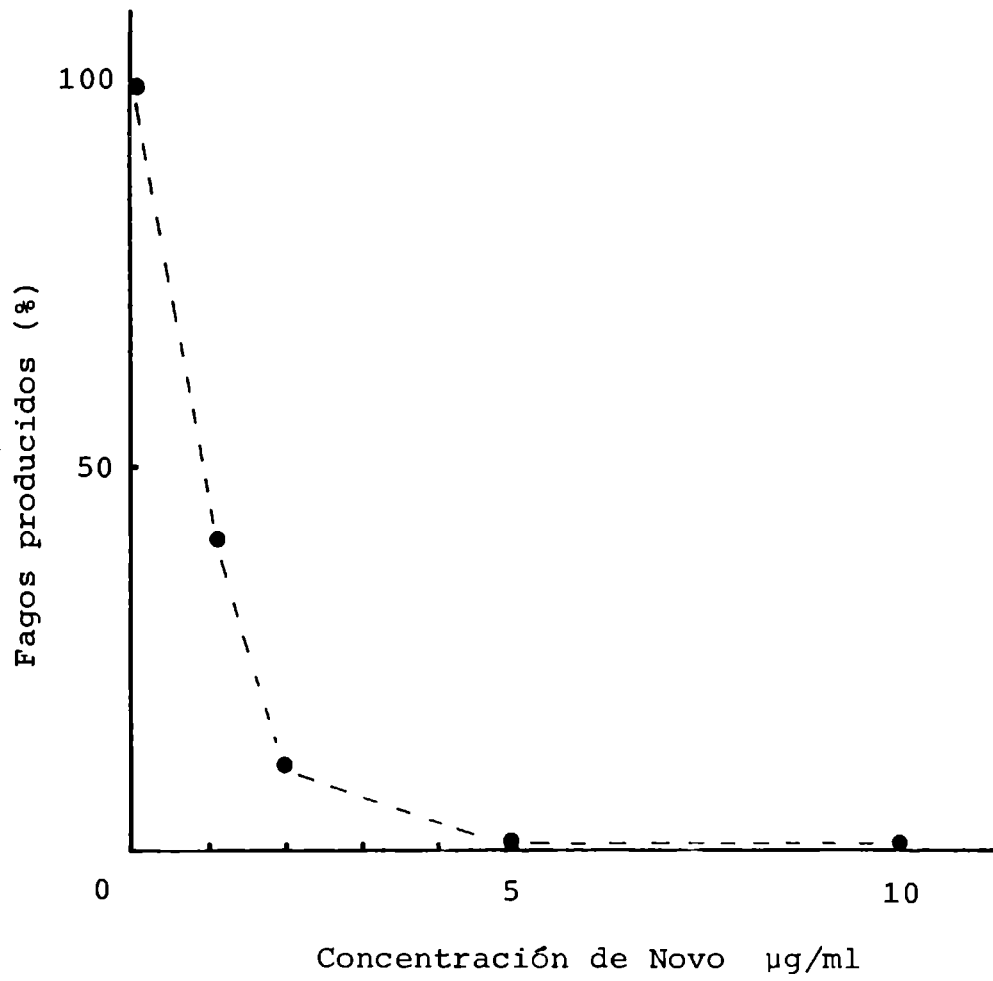
| Cepa bacteriana                                   | Antibiótico agregado (a) | Tiempo de lisis (min. p.i.) (b) | Producción fagos/bacteria infectada (b) |
|---|--------------------------|---------------------------------|---|
| 168M<br>(nov <sup>s</sup> ,<br>nal <sup>s</sup> ) | --                       | 54 $\pm$ 4                      | 29 $\pm$ 8                              |
|   | Nal                      | 260 $\pm$ 40                    | 2.7 $\pm$ 0.6                           |
|   | Novo                     | 310 $\pm$ 8                     | 0.07 $\pm$ 0.01                         |
| QM27<br>(nov <sup>r</sup> )                       | --                       | 55 $\pm$ 4                      | 28 $\pm$ 4                              |
|   | Novo                     | 66 $\pm$ 2                      | 18 $\pm$ 3                              |
| PB1706<br>(nal <sup>r</sup> )                     | --                       | 62 $\pm$ 5                      | 8 $\pm$ 2                               |
|   | Nal                      | 126 $\pm$ 11                    | 0.8 $\pm$ 0.3                           |
| JA60A<br>(nal <sup>r</sup> )                      | --                       | 73 $\pm$ 7                      | 17 $\pm$ 1.5                            |
|   | Nal                      | 186 $\pm$ 25                    | 0.25 $\pm$ 0.2                          |

(a) Los antibióticos fueron agregados a los 2 minutos p.i. a concentración final de 150 µg/ml de Nal y 5 µg/ml de Novo.

(b) Los resultados se expresan como los valores medios  $\pm$  DS (9 > n < 3).



Figura 3



Se infectó a *B. subtilis* 168M con SP01(+) a m.i. 10, a los dos minutos p.i. se agregaron las cantidades de Novo indicadas a alícuotas del cultivo. Los rendimientos fueron medidos después de la lisis. En ausencia del inhibidor se obtuvieron 30 fagos por bacteria infectada.

10 µg/ml de Novo (60), PB1706 (16) y JA60A (obtenida en el presente trabajo), estas dos últimas resistentes a 300 y 250 µg/ml de Nal (nal<sup>r</sup>).

Si analizamos los resultados obtenidos sobre la cepa QM27 en presencia de 5 µg/ml de Novo agregado a los 2 minutos p.i., observamos que esta droga no afecta el tiempo de lisis y lo hace escasamente sobre la producción de bacteriofagos (Tabla 1). Por experimentos de crecimiento en un ciclo no encontramos diferencias con lo observado por Gage y Fujita (41) en el tiempo necesario para producir un equivalente de fago por bacteria infectada (resultados no mostrados).

En cambio, tras el agregado de Nal en las cepas bacterianas PB1706 y JA60A infectadas con SP01(+) se observó un retardo en el tiempo de lisis y una marcada inhibición de la producción de fagos, similar a la observada sobre la cepa sensible a Nal (Tabla 1).

b) EFECTOS DE Nal Y Novo SOBRE LA SINTESIS DE DNA EN *B. subtilis* INFECTADO CON SP01(+)

Para medir la incorporación acumulativa de <sup>3</sup>HAdE en material álcali estable precipitable por ácido, en el bacteriofago silvestre, se utilizaron las cepas bacterianas 168M, PB1706 y QM27.

Cada cepa fue infectada con SP01(+) a m.i. 10, adicionando al mismo momento la marca. A los 2 minutos p.i. se agregó a alícuotas del cultivo 150 µg/ml de Nal o 5 µg/ml de Novo. Las muestras se procesaron según Materiales y Métodos.

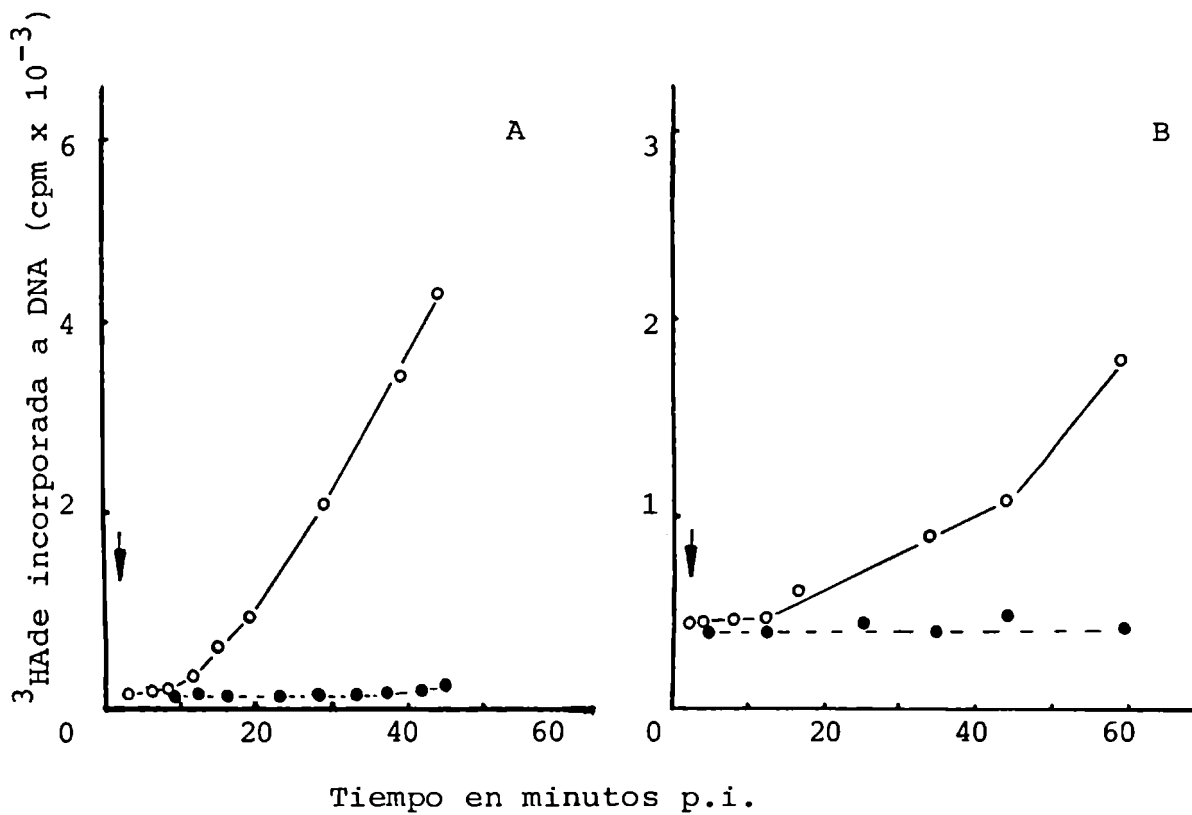
El análisis de la capacidad de síntesis de DNA arrojó resultados concordantes con la Tabla 1. Tal como se muestra en la Figura 4A, el bacteriofago silvestre comienza la síntesis de DNA entre los 10 a 12 minutos p.i. sobre la cepa 168M, pero es incapaz de incorporar  $^3\text{H}$ AdE en DNA en presencia de Nal. Si analizamos el panel B, observamos que sobre la cepa PB1706 ( $\text{nal}^r$ ) y en ausencia del antibiótico, la síntesis de DNA viral presenta una velocidad menor de incorporación, pero aún es activa (Figura 4B). En presencia del antibiótico el sistema es incapaz de incorporar marca en material álcali estable. En ambos casos (Panel A y B) la inhibición por Nal es del orden del 99%. Estos resultados indican que el bacteriofago silvestre requiere un factor inhibible por Nal y distinto de la subunidad A de la DNA girasa bacteriana para mantener una activa síntesis de DNA.

Al analizar el efecto de Novo sobre la cepa sensible 168M, observamos que inhibe un 99% de la síntesis de DNA viral, mientras que en ausencia del antibiótico el fago silvestre replica de acuerdo a los datos existentes en bibliografía (Figura 5A). En la Figura 5B se muestra la incorporación acumulativa de marca por el fago silvestre al infectar la cepa QM27 ( $\text{nov}^r$ ). En ausencia del antibiótico la síntesis de DNA se inicia entre los 12 a 13 minutos p.i., tiempo éste que no varía al agregarle el antibiótico.

En el cultivo con Novo la capacidad de incorporar marca es del orden del 40% con respecto a la que se obtiene en ausencia del antibiótico, pero aún así la producción de fagos, tal como fuera observado en la Tabla 1, es escasamente afectada.

Figura 4

Síntesis de DNA en *B. subtilis* 168M y PB1706 infectados por SPO1(+) en ausencia y presencia de Nal.

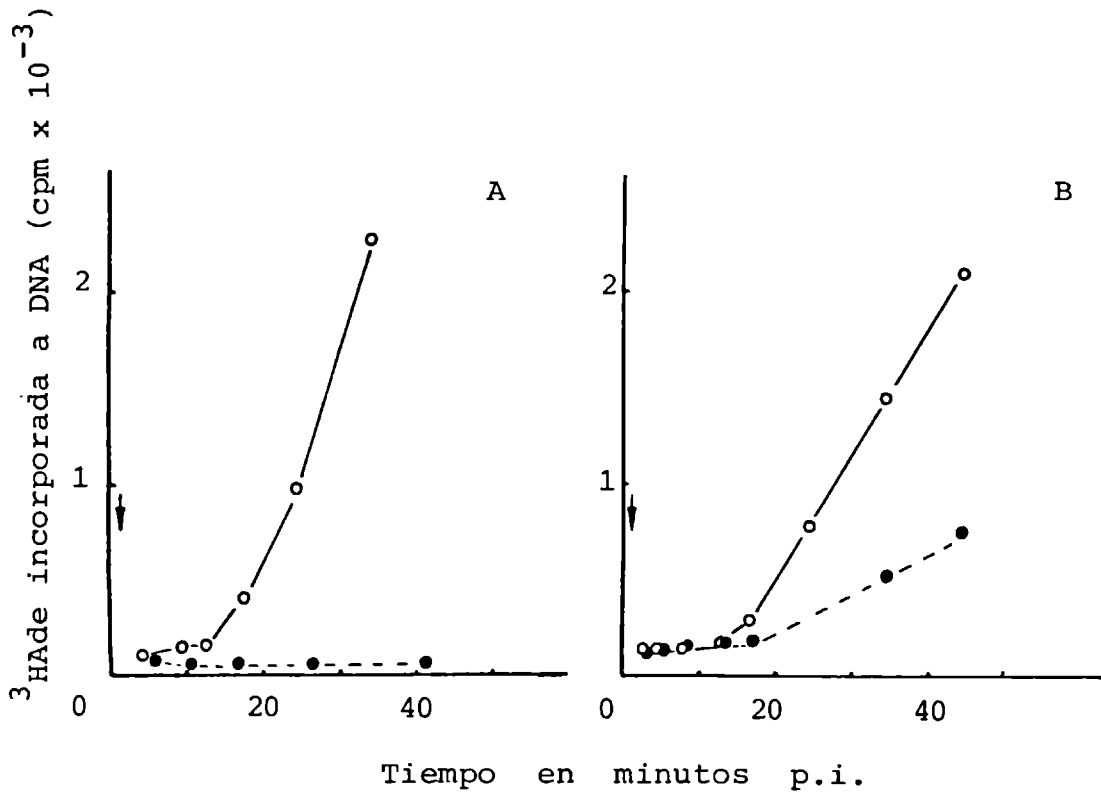


Se infectaron las cepas de *B. subtilis* 168M (A) y PB1706 (B) con SPO1(+) a m.i. 10. Al momento de la infección se agregaron a cada ensayo 17 µg/ml de <sup>3</sup>HAdenina con actividades específicas de 2.5 µCi/ml y 10 µCi/ml, respectivamente. A los dos minutos p.i. a una alícuota de cada cultivo se le agregó 150 µg/ml de Nal. La flecha indica el momento de agregado. A distintos tiempos se tomaron muestras de 0.2 ml y se procesaron según Materiales y Métodos.

(o) Control sin antibiótico; (●) Ensayo con Nal.

Figura 5

Síntesis de DNA en *B. subtilis* 168M y QM27 infectados con SP01(+) en presencia y ausencia de Novo.



Se infectaron las cepas de *B. subtilis* 168M (A) y QM27 (B) con el bacteriofago SP01(+) a m.i. 10. Al momento de la infección se agregó a cada ensayo 17  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de  $^3\text{HAdenina}$  con actividad específica de 2.5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ . A los 2 minutos p.i. a una alícuota de cada cultivo se le agregó 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Novo. La flecha indica el momento de agregado. A distintos tiempos se tomaron muestras de 0.2 ml y se procesaron según Materiales y Métodos.

(o) Control sin antibiótico; (●) Ensayo con Novo.

De los resultados hasta aquí presentados se puede apreciar que SP01(+) requiere para su desarrollo una función codificada por el fago, sensible a Nal, distinta de *gyrA*, y una función sensible a Novo, aportada por la bacteria (*gyrB*). Para esta última hipótesis nos apoyamos en que, al infectar una cepa bacteriana que posee el carácter  $\text{nov}^r$ , el fago silvestre es capaz de incorporar marca.

En procura de corroborar la existencia de esa función viral se buscó obtener mutantes del fago SP01 capaces de resistir a 150  $\mu\text{g/ml}$  de Nal. Para ello se mutagenizó a la cepa PB1706 infectada con un stock viral o con varios clones de SP01(+) con el fin de obtener diversos mutantes resistentes por eventos independientes. Los lisados obtenidos se plaquearon en presencia y ausencia de Nal. Sin antibiótico se observa un rendimiento del 10% con respecto al habitual en ausencia del mutágeno. Esa escasa letalidad nos induce a pensar que la posibilidad de mutaciones dobles o triples sería baja. En presencia de 200  $\mu\text{g/ml}$  de Nal observamos una inhibición del orden del 95% con respecto al título en ausencia del antibiótico. Las placas de lisis obtenidas en esta última condición fueron picadas con palillo estéril en altas y bajas dosis de Nal, y posteriormente tituladas. Se lograron aislar, como se describe en Materiales y Métodos, 17 mutantes, a los que llamamos J1 a J17, de los cuales 11 fueron obtenidos por eventos independientes.

Se consideró resistente a aquel mutante que, en presencia de 150  $\mu\text{g/ml}$  de Nal, su eficiencia de plaqueo no era deprimida más de un 30%. El mutante J1, aún en presencia de 300  $\mu\text{g/ml}$  presentaba una eficiencia de plaqueo del orden del 68%.

En un paso posterior se analizó el comportamiento de este último mutante en medio líquido. Para ello se infectó un cultivo de *B. subtilis* PB1706 ( $\text{nal}^r$ ,  $\text{nov}^s$ ) a m.i. 10 con el bacteriofago mutante SPO1 J1. A los 2 minutos p.i., a una alícuota del cultivo se le agregó 200  $\mu\text{g/ml}$  de Nal o 5  $\mu\text{g/ml}$  de Novo. Como se puede observar en la Tabla 2 este mutante es capaz de desarrollar en presencia de altas dosis de Nal (8 mM) siendo inhibido solamente un 24%, pero en presencia de 5  $\mu\text{g/ml}$  de Novo es tan sensible como el bacteriofago silvestre. De esta manera reafirmamos el concepto anteriormente enunciado, incapacidad de desarrollar en presencia de Novo sobre una cepa bacteriana sensible a éste, y corroboramos en este mutante resistente la independencia de los blancos de acción de estos inhibidores.

c) BUSQUEDA DEL GEN/ES QUE CODIFIQUE/N A LA SUBUNIDAD CON FUNCION DE CORTE Y REUNION DE LA SPO1 DNA TOPOISOMERASA

Ninguno de los bacteriofagos de la serie J ( $\text{nal}^r$ ) nos permitió hacer experimentos de complementación por carecer de una condición no permisiva, y tampoco pudimos realizar experimentos de recombinación por no lograr obtener una inhibición mayor del 95% cuando infectábamos a PB1706, en presencia de Nal, con el fago silvestre.

Una manera de resolver este problema sería mediante el hallazgo de mutantes sensibles a la temperatura en la función blanco de Nal. Pensamos que tal vez la mutación J ( $\text{nal}^r$ ) pudiera haber introducido alguna alteración en la proteína correspondiente haciéndola más inestable. Por esta razón estudiamos la sensibilidad a la temperatura para

Tabla 2

Efecto de Nal y Novo sobre el desarrollo de SPO1 J1 en  
*B. subtilis* PB1706 (nal<sup>r</sup>, nov<sup>s</sup>)

| Antibiótico<br>agregado <sup>(a)</sup> | Producción<br>fago/bacteria infectada <sup>(b)</sup> |
|--|--|
| ---                                    | 10 $\pm$ 2.6   |
| Nal (200 µg/ml)                        | 7.6 $\pm$ 1.1  |
| Novo (5 µg/ml)                         | 0.2 $\pm$ 0.1  |

(a) Los antibióticos fueron agregados a los 2 minutos p.i.

(b) Se indican los valores medios de tres determinaciones  
 $\pm$  DS.



producir placas de lisis de los 17 mutantes J. Lamentablemente ninguno de ellos mostró diferencias con el comportamiento de SP01(+).

Hemos intentado varios caminos en procura de obtener un mutante en la función  $\text{nal}^r$  que nos permitiera hacer experimentos genéticos, pero todos ellos fueron negativos. En condiciones no permisivas un mutante como el buscado podría tener afectada la iniciación de la síntesis de DNA (DD) o directamente ser deficiente en replicación (DO). A continuación se incluyen las observaciones que justifican la primera propuesta y los experimentos realizados, y en el Capítulo III se detallan los estudios con los mutantes DO.

Mac Carthy (94) había observado que tres mutantes DD de T4 (que en condiciones no permisivas producían escasa progenie) eran incapaces de desarrollar en presencia de los inhibidores de la DNA girasa. En las mismas condiciones el silvestre era insensible a los inhibidores. Stetler y col. (165) y Liu y col. (88) demostraron que los productos activos de los genes de estos tres mutantes en cuestión cooperaban para formar una proteína con actividad DNA topoisomerasa II, denominada T4 DNA topoisomerasa.

De estas observaciones se concluye que T4(+) emplea una topoisomerasa propia y que los mutantes DD pueden sustituirla, con baja eficiencia, por la DNA girasa bacteriana. Pensamos que SP01, al igual que T4, podría usar alternativamente a la DNA girasa bacteriana y que el mutante en cuestión pudiera haber sido clasificado como DD.

Si dentro del grupo de mutantes DD se encontrara mutado el gen responsable de codificar a la proteína de corte y reunión de la SP01 DNA topoisomerasa, al inhibir a la DNA

girasa bacteriana, este mutante sería incapaz de desarrollar.

Se analizaron representantes de los cistrones DD, y otros con terminación anticipada (DA) e intermedios (D int). Para ello se infectó 168M con los mutantes en cuestión y a los 2 minutos p.i. se les agregó 50 µg/ml de Nal. Esta dosis, 50 µg/ml, es suficiente para frenar el desarrollo y la síntesis de DNA de esta cepa bacteriana (41 y resultados no mostrados). A los 12 minutos p.i. el cultivo fue diluído 1000 veces con el objeto de evitar reinfecciones con los fagos libres. De acuerdo a este diseño el número mínimo de fagos producidos que podríamos detectar es de 0,03 fagos/bacteria infectada.

Se analizaron los mutantes F47, F45, F6, F31 y F11, representantes de los cistrones 2b, 3, 11, 12 y 14, respectivamente. El rendimiento, en condiciones no permisivas, de F47, F31 y F11 era tan bajo que no permitía observar una disminución causada por el antibiótico.

El mutante F45 presentó resultados algo variables de un experimento a otro, pero aún así observamos en la Tabla 3 que en presencia de Nal se alargó al doble el tiempo de lisis, con una inhibición del desarrollo viral entre un 58% a un 80%. En cambio el mutante F6 no parece ser afectado por la dosis de Nal que inhibe a la replicación bacteriana.

#### DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En un primer paso medimos la sensibilidad de SP01 a los inhibidores de la DNA girasa. Esta inhibición, como veremos más adelante, no puede ser atribuída a un efecto secundario.

Tabla 3

Progenie y tiempo de lisis de los mutantes DA en 168M con y sin agregado de Nal.

| Mutante | Tiempo de lisis<br>(min. p.i.) |                    | Producción<br>fagos/bacteria infectada |                     |
|---------|--------------------------------|--------------------|--|---------------------|
|         | - Nal                          | + Nal (a)          | - Nal                                  | + Nal (a)           |
| F45     | $100 \pm 3^{(b)}$              | $240 \pm 55^{(b)}$ | $1.8 \pm 2^{(b)}$                      | $0.2 \pm 0.2^{(b)}$ |
| F6      | $166 \pm 30$                   | $173 \pm 23$       | $0.3 \pm 0.2$                          | $0.2 \pm 0.1$       |

Los bacteriofagos F47 (DD), F31 (DD) y F11 (D int) dieron valores de progenie menores que el blanco experimental que fue de 0.03 fagos/bacteria infectada (fagos libres).

(a) A los 2 minutos p.i. se agregó 50  $\mu\text{g/ml}$  de Nal.

(b) Se indican los valores medios de tres determinaciones  $\pm$  DS.

Cuando se creció al fago silvestre sobre una cepa bacteriana resistente a Novo observamos que en presencia del antibiótico no se afecta el tiempo de lisis y no se altera significativamente la producción de bacteriofagos. Al analizar la síntesis de DNA en presencia de Novo observamos una menor cantidad de marca incorporada, pero como vimos anteriormente la producción de progenie es escasamente afectada. Quizás esta baja incorporación se deba a que *gyrB* resistente sea aún parcialmente inhibida, o bien a que la mutación que introdujo el carácter *nov<sup>r</sup>* también haya introducido una alteración en la eficiencia enzimática de *gyrB*. Al respecto cabe citar que recientemente en *E. coli* se ha demostrado que mutantes resistentes en *gyrB* son menos activos para mantener un determinado grado de superenrollamiento negativo (181).

Estos resultados nos permiten concluir que el desarrollo de SP01 tanto como su síntesis de DNA son dependientes de una función sensible a Novo, *gyrB*, codificada por la célula huésped, y que la sensibilidad a Novo es eliminada al introducir el carácter *nov<sup>r</sup>* en la DNA girasa bacteriana.

Los resultados obtenidos con Nal indican que el fago silvestre es incapaz de desarrollar tanto en la cepa sensible como en la resistente en presencia de 150 µg/ml de Nal. Sin embargo, aún en presencia de concentraciones mayores de Nal, no logramos inhibir el desarrollo viral más de un 97% (sobre JA60A). Una explicación plausible sería que SP01 utiliza con baja eficiencia otra topoisomerasa. Kano y col. (70a) demostraron, en *E. coli*, que más del 15% del superenrollamiento del DNA es introducido por mecanismos independientes a la DNA girasa. Si en *B. subtilis*-SP01 ocurriese algo

similar, el sistema podría ser capaz de funcionar con una eficiencia del 5%.

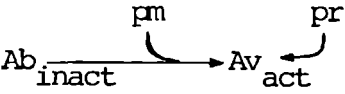
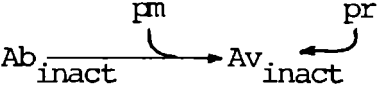
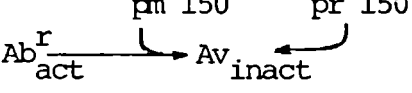
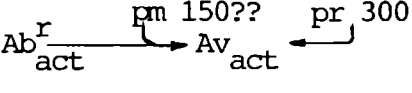
Al analizar la incorporación acumulativa de adenina tritiada en el DNA viral observamos inhibición de ésta en presencia del antibiótico, tanto en la cepa bacteriana sensible como en la resistente a Nal.

Gage y Fujita (41) demostraron que a dosis de Nal en que se inhibe la replicación bacteriana (50  $\mu\text{g/ml}$ ) el bacteriofago silvestre es capaz de llevar adelante un ciclo lítico normalmente. Ellos sugirieron que: a) SP01 no requería la acción de la actividad celular blanco de Nal; b) o bien la modificaba haciéndola insensible a Nal. Por los trabajos de Sarachu (150) y los aquí presentados descartamos la hipótesis (b) ya que 150  $\mu\text{g/ml}$  de Nal inhiben el desarrollo viral sobre la cepa sensible. De los resultados obtenidos cuando infectamos con SP01(+) a la cepa resistente, en presencia de 150  $\mu\text{g/ml}$  de Nal, afirmamos la hipótesis (a). Es decir que en esta última condición la función celular blanco de Nal es activa, pero aún así el fago es incapaz de dar progenie.

Por lo tanto podemos decir que SP01 no utiliza (al menos mayoritariamente) a *gyrA* bacteriana, sino que codifica una proteína que la reemplaza, o bien que la modifica, pero en ambos casos el producto viral es sensible a Nal a dosis mayores que las necesarias para inhibir a la proteína blanco bacteriana (según los resultados obtenidos con J1).

En el Esquema 1 se presenta un análisis de las posibilidades que nos han llevado a las conclusiones antes enunciadas. En el punto a) indicamos que a dosis de 50  $\mu\text{g/ml}$  de Nal el fago es capaz de llevar adelante un ciclo viral.

Esquema 1

| Condición | Concentración<br>de antibiótico<br>(µg/ml) | Interpretación   | Producción<br>de<br>fagos |
|-----------|--|--|---------------------------|
| a         | 50   |    | Sí                        |
| b         | 150  |  | No                        |
| c         | 150  |  | No                        |
| d         | 200  |  | Sí                        |

La subunidad A bacteriana de la DNA girasa (Ab) es inactiva (inact) en presencia de 50 µg/ml de Nal, en cambio la subunidad de origen viral (Av) es activa (act) a esa dosis pero inactiva en presencia de 150 µg/ml de Nal. Producto modificador (pm) que transformaría a Ab en producto activo Av. (pr) producto viral que reemplazaría a Ab.

En esta situación puede existir producción de fagos porque SP01 no requiere a la proteína blanco de Nal (Ab) o por la existencia de pm o pr. En b) se demuestra la necesidad de un producto sensible a Nal (Av activo) pero no se concluye si éste tiene actividad de pm o pr. En el punto c) cuando se emplea a gyr A resistente, Ab<sup>r</sup> es activa pero como en la posición anterior Av es inactiva. O sea pm 150 o pr 150 serían sensibles a 150 µg/ml de Nal. Es improbable que pm 150 modifique a Ab<sup>r</sup> y simultáneamente tenga un sitio sensible a Nal. En la posibilidad d) la enzima viral es activa porque pr 300 es resistente. Por otra parte, Ab<sup>r</sup> no sería modificable por el fago o, si lo fuera, al introducirle esa modificación se podría producir la pérdida del carácter nal<sup>r</sup> de la proteína celular, o ésta podría ahora no ser reconocida por la subunidad B.

Por estas razones la hipótesis más simple fue adjudicarle al fago la capacidad para codificar un polipéptido con función de corte y reunión en sitios específicos, y ese polipéptido (sensible a Nal 150 µg/ml), unido a la subunidad B bacteriana (sensible a Novo 5 µg/ml) constituiría una enzima con actividad DNA topoisomerasa sobre el DNA viral (enzima ésta llamada en el presente trabajo SP01 DNA topoisomerasa).

Esta hipótesis, fundamentada en la independencia de los blancos de acción, se vio reforzada por el hecho de que SP01(+) en *B. subtilis* QM27 (nal<sup>S</sup>, nov<sup>r</sup>) es tan sensible a Nal como lo es sobre *B. subtilis* 168M (nal<sup>S</sup>, nov<sup>S</sup>) (resultados no mostrados).

Una vez demostrada la existencia de la función viral se hizo interesante ubicar en el mapa físico al gen que

codifica a ese producto supuestamente con actividad de corte y reunión en sitios específicos, por analogía con gyr A. Este gen, como veremos más adelante (Capítulo II), deberá ser transcripto a tiempos tempranos.

Con los mutantes de la serie J, como ya hemos dicho, no podemos hacer análisis genéticos por carecer de una condición no permisiva. Un mutante que reúna las condiciones buscadas (caída de la eficiencia de plaqueo a  $10^{-4}$  en condiciones no permisivas) podría ser termosensible, supresible o hipersensible a Nal (sensible a dosis de 50  $\mu\text{g/ml}$  de Nal). Se han intentado estas tres posibilidades (resultados no mostrados) pero sin éxito. El mayor inconveniente, que no pudimos salvar, fue que en presencia de 150  $\mu\text{g/ml}$  de Nal el silvestre no era inhibido más de un 95%.

Dentro de los mutantes DA analizados habíamos mostrado (Tabla 3) que sólo el mutante F45 (representante del cistrón 3) presenta una moderada inhibición en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  de Nal, presentando un efecto similar al observado en T4, pero podemos descartar a este mutante porque, a diferencia de T4, la función buscada es vital a tiempos tempranos (será analizado más adelante) y es requerida para la iniciación de la síntesis de DNA. Este mutante comienza "normalmente" su replicación, aunque la termina anticipadamente (115). Si la función buscada tuviese un comportamiento similar a la DNA girasa, o sea de vital importancia para la iniciación de la replicación (110), podríamos decir que el cistrón representado por F45 no codifica a la función buscada.

Además se ha descripto recientemente que este mutante es transcripto a tiempos medios y tardíos (13, 143) y su función principal sería intervenir en el ensamblado de los



viriones (46). Por resultados que analizaremos más adelante sabemos que el gen que codifique a la función buscada deberá ser transcrito a tiempos tempranos, razón que nos hace descartar a F45.

Analizando el mapa físico de SP01 se observa que los cistrones que cumplen con el requisito antes descrito son: 2b, 27, 28 y 32 y la zona de redundancia terminal. De ésta y del cistrón 2b se conoce muy poco.

De los 17 promotores tempranos (Pe) conocidos, 12 se hallan en la zona redundante terminal, 1 en la región 29-33 Kpb (posición que parte de numerar las bases de izquierda a derecha, sin la redundancia, 0 - 132 Kpb), 1 en la región 132 Kpb y tres en la región 90 - 115 Kpb (zona cistrón 28). De estos últimos tres, el promotor de la zona 27 - 28 (Kpb 91) es capaz de transcribir "in vitro" un mRNA de 2,7 Kpb (que equivaldría, si es traducido totalmente, a una proteína de peso molecular (PM) 98 K ), aunque no podemos descartar que "in vivo" el tamaño del mRNA sea menor (25).

Dado que desde este promotor se transcriben dos funciones vitales conocidas, gp27 (25, Capítulo III) y gp28 (56) nos resulta difícil suponer que además se transcriba otra función vital, como sería la proteína blanco de Nal. Ahora bien, al no conocer el peso molecular de este último gen/es es difícil realizar mayores análisis.

En la zona de los cistrones 29 - 30 existe un segundo Pe, región 99 Kpb, que es capaz de transcribir "in vitro" un mRNA de 3.2 Kpb (que equivaldría a una proteína de PM 118 K). Ahora bien, se desconoce cuál de los dos cistrones es transcrito desde ese promotor. El tercer Pe se halla en la región 113 Kpb y es capaz, post-traduccion del mensajero,

de formar una proteína de 42 K de PM. Si suponemos que el gp29 (del cual se desconoce su peso molecular) juega un rol de importancia en el freno de la replicación bacteriana y ésta se llevaría a cabo desde los 2 minutos p.i. hasta el freno total a los 6 minutos p.i. podemos suponer que el gp29 podría ser transcripto desde el promotor ubicado a los 99 Kpb.

Del promotor Pe 113 Kpb no se dispone mayor información.

Reeve y col. (136) han demostrado que el mutante F38, representante del cistrón 32, es transcripto a tiempos tempranos, pero esta observación será analizada más en detalle en el Capítulo III.

Con respecto a la zona redundante han sido descritos 12 promotores (13; 79; 143), desconociéndose las funciones transcriptas por éstos. Si pensamos que el gen/es en cuestión se halla/n en esta zona redundante, para poder ubicarlo deberíamos tener un genoma de copia única (delección de uno de los extremos redundantes), porque de ese modo eliminamos la posibilidad de que el sistema pueda leer al gen desde el otro extremo redundante. Es difícil, por la necesidad antes exigida, hacer experimentos genéticos en esta región.

Por lo antes dicho se hace necesario explicar la existencia de los mutantes en los cistrones 35 y 36 (transcriptos desde la zona redundante). Recientemente usando mutantes termosensibles de SP01, Glassberg y col. (54) demostraron que el mutante representante del cistrón 32 complementa (se analiza la complementación por visualización de la replicación) con el resto de los cistrones del genoma,

pero no lo hace con los cistrones 35 y 36 (55). Quizás éstos son transcriptos como policistrón desde el 32, y el redundante en el otro extremo puede no ser copiado.

La posibilidad de un cistrón aún no descripto es probable, ya que sólo conocemos un 70% de los productos codificados por el genoma del fago, si bien no necesariamente todo el genoma tiene que tener sentido. Por ejemplo, en el bacteriofago lambda casi el 20% de su genoma no codifica función, o la que codifica no es vital, ya que extrayéndole esa zona es capaz de llevar adelante normalmente tanto un ciclo lítico como uno lisogénico.

## CAPITULO II

-

## EFFECTOS DE NOVO SOBRE EL PROGRAMA DE TRANSCRIPCION VIRAL

De los resultados presentados en el capítulo precedente podemos extraer las siguientes conclusiones:

- a) Novobiocina inhibe el desarrollo de SP01 silvestre sobre la cepa 168M (nov<sup>S</sup>);
- b) El bacteriofago SP01, al menos para su síntesis de DNA, utiliza una topoisomerasa II compuesta por la subunidad B de la DNA girasa de la célula huésped y por una proteína sensible a 150 µg/ml de Nal codificada por el genoma viral.

De esta SP01 DNA topoisomerasa el rol más conocido es el de la subunidad B, aportada por la bacteria, que a su vez es muy parecida a su homóloga de *E. coli* (167).

Los dos objetivos del presente capítulo fueron estudiar el efecto de Novo sobre la regulación de la transcripción viral y la presencia o no de RNAs transcriptos tardíamente cuando la síntesis de DNA es inhibida por la droga.

En el bacteriofago T4, de *E. coli*, se ha demostrado acople entre la replicación y la transcripción viral tardía (140, 141). Una hipótesis atribuye este acople a que un DNA recientemente replicado estaría en estado competente para ser transcripto y esta competencia se iría perdiendo a medida que el DNA madura. Con ello probablemente disminuirían las zonas de cadena simple accesibles a la RNA pol (17, 193, 194, 195). Otra hipótesis, más abierta, es que al menos algunas de las proteínas de replicación interactúan con el sistema transcripcional (130).

En el sistema SP01-*B. subtilis* los datos existentes sobre el acople son contradictorios, hecho por el cual

utilizamos como diseño experimental el inhibir a la síntesis de DNA, por Novo, y en esas condiciones analizar la transcripción viral tardía.

a) EFECTOS DE NOVO SOBRE LA SINTESIS DE DNA, RNA Y PROTEINAS EN *B. subtilis* 168M

Recientemente Matter y Pointer (93) demostraron, en *E. coli*, que la acción de Novo es reversible y con escasos efectos secundarios. Con el fin de conocer su efecto sobre nuestro sistema, medimos la síntesis de DNA, RNA y proteínas tras el agregado de Novo, en *B. subtilis* 168M (nov<sup>S</sup>) creciendo en medio líquido.

Síntesis de DNA

La síntesis de DNA fue medida en *B. subtilis* 168M por la incorporación acumulativa de adenina tritiada (2.5  $\mu$ Ci/ml y 17  $\mu$ g/ml) adicionada a tiempo cero, en material álcali estable precipitable por TCA. A los 16 minutos de agregada la marca a alícuotas del cultivo inicial se le adicionaron cantidades crecientes de Novo (0,5; 1; 2 y 5  $\mu$ g/ml) con el fin de determinar la dosis que inhibe la síntesis de DNA. Las muestras fueron procesadas según Materiales y Métodos.

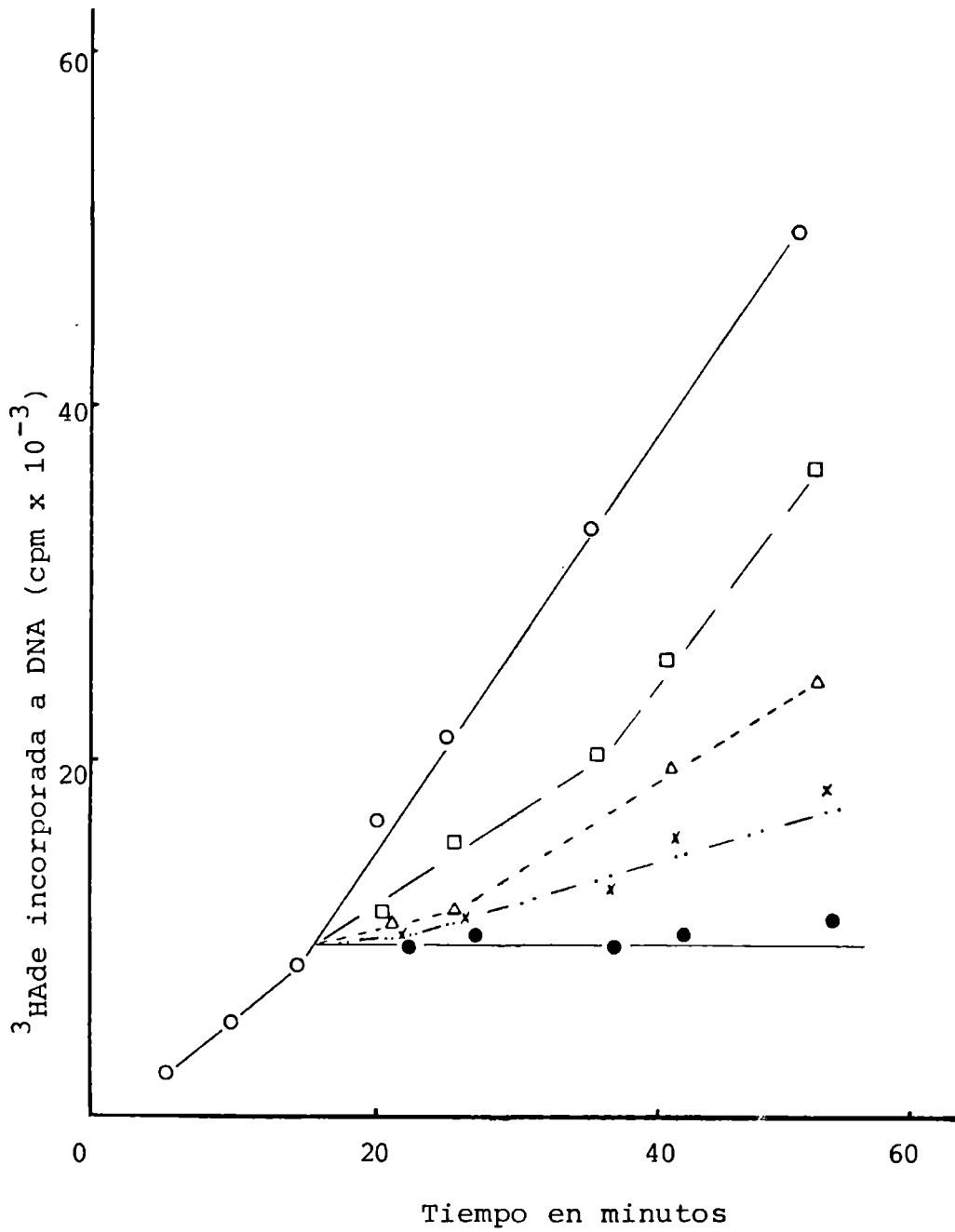
Como se puede observar en la Figura 6 concentraciones crecientes de Novo muestran capacidades inhibitorias también crecientes, llegándose a un 98% con 5  $\mu$ g/ml.

Síntesis de RNA

La síntesis de RNA en *B. subtilis* 168M fue medida por la incorporación acumulativa de adenina tritiada (2,5  $\mu$ Ci/ml

Figura 6

Síntesis de DNA en *B. subtilis* 168M en presencia de cantidades crecientes de Novo.



Medida de la incorporación de  $^3\text{HAdé}$  ( $2.5 \mu\text{Ci/ml}$  y  $17 \mu\text{g/ml}$ ) agregada a tiempo cero. Dieciséis minutos después, a alícuotas del cultivo se le agregaron cantidades crecientes de Novo ( ) 0.5; ( ) 1; (x) 2; (o)  $5 \mu\text{g/ml}$  y (o) control sin Novo.

y 17  $\mu\text{g/ml}$ ) adicionada a tiempo cero en material álcali lábil precipitable por TCA. Dieciséis minutos después a una alícuota del cultivo se le agregó 5  $\mu\text{g/ml}$  de Novo.

En la Figura 7A se puede observar que el antibiótico sólo afecta parcialmente la síntesis de RNA, al menos durante los primeros 25 minutos. A tiempos mayores, la pendiente comienza a decaer para frenarse finalmente (resultados no mostrados). Este efecto puede ser atribuible a que ciertos operones (como en *E. coli*) requieren un determinado estado topológico (149) para su transcripción y la ausencia de la síntesis de esos mRNAs podría disparar un sistema de terminación de transcripción. Por otro lado, recientemente Oostra y col. (117) demostraron, en *E. coli*, que en presencia de Novo se reducía, selectiva y drásticamente, la síntesis de RNA ribosomal. En estos dos casos se postuló que el freno se debe a una modificación del estado topológico y no a un efecto secundario del inhibidor.

#### Síntesis de proteínas

La síntesis de proteínas en *B. subtilis* 168M fue medida por la incorporación de leucina tritiada (1,5  $\mu\text{Ci/ml}$  y 0,024  $\mu\text{g/ml}$ ) agregada a tiempo cero, en material precipitable por TCA. Luego de 16 minutos, a una alícuota del cultivo se le agregó 5  $\mu\text{g/ml}$  de Novo. Las muestras fueron procesadas según Materiales y Métodos.

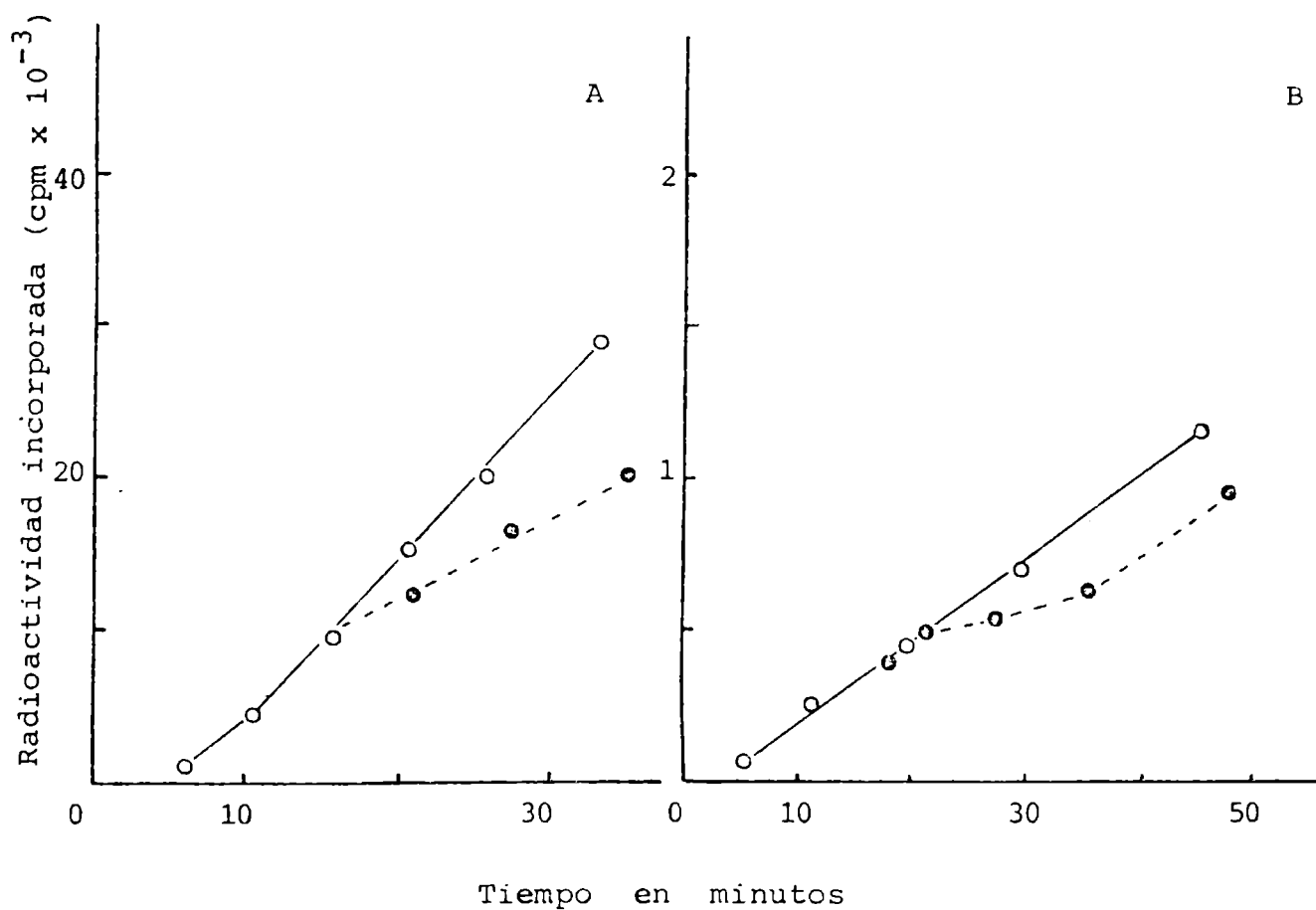
Como se puede observar en la Figura 7B, sólo se modifica ligeramente la curva de incorporación para luego mantener igual pendiente que el control.

Este escaso efecto no podemos atribuirlo a una deficiente permeabilidad del sistema a Novo, ya que al analizar



Figura 7

Efecto de Novo sobre la síntesis de RNA y proteínas en *B. subtilis* 168M



A tiempo cero se adicionó <sup>3</sup>HAdé para medir la incorporación en RNA (2.5 µCi/ml y 17 µg/ml) (A), o <sup>3</sup>HLeu (1.5 µCi/ml y 0.024 µg/ml) en proteínas (B) por 168M. Las muestras fueron tomadas a distintos tiempos y procesadas según Materiales y Métodos.

(o) Control en ausencia de Novo; (●) Ensayo con 5 µg/ml de Novo agregados al minuto 16.

su efecto sobre la síntesis de DNA y RNA observamos que el antibiótico actúa rápidamente.

A tiempos mayores (resultados no mostrados) la síntesis es afectada parcialmente. Estos resultados son los esperados ya que a esos mismos tiempos la transcripción se encuentra frenada. Por consiguiente este efecto no puede ser atribuible a una acción secundaria del antibiótico.

b) EFECTO DE NOVO SOBRE LA SINTESIS DE DNA, RNA Y PROTEINAS EN *B. subtilis* 168M INFECTADO CON SPO1 SILVESTRE

Con el objeto de reafirmar la acción de Novo sobre la síntesis de DNA viral y descartar algún efecto secundario sobre la síntesis de RNA total y proteínas se realizaron experimentos infectando *B. subtilis* 168M con SPO1(+) y midiendo luego la síntesis de DNA, RNA y proteínas, tanto en ausencia como en presencia de Novo.

Síntesis de DNA

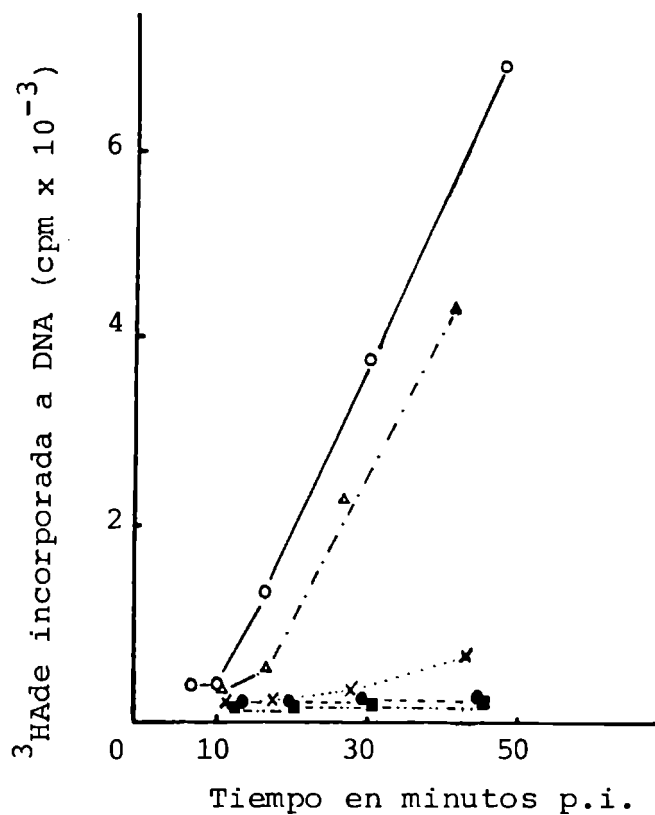
La síntesis de DNA viral fue medida en *B. subtilis* 168M infectado con SPO1(+) a m.i. 10, por la incorporación de <sup>3</sup>HAdE agregada 1 minuto p.i.. A los 2 minutos p.i. a alícuotas del cultivo se le agregaron cantidades crecientes de Novo (1, 2, 5 y 10 µg/ml), con el fin de determinar la dosis que inhibe la síntesis de DNA viral.

Como se puede ver en la Figura 8 la dosis de Novo (5 µg/ml) que inhibe un 99% la síntesis de DNA viral, tal como se viera en la Figura 6, es la misma que inhibe la síntesis de DNA bacteriano.

El agregado de 1 µg/ml sólo cambia inicialmente la

Figura 8

Síntesis de DNA del bacteriofago SPO1 en *B. subtilis* 168M en presencia de cantidades crecientes de Novo.



Medida de la incorporación de  $^3\text{HAd}$  ( $6 \mu\text{Ci/ml}$  y  $17 \mu\text{g/ml}$ ) agregada al minuto post-infección. A los 2 minutos p.i. a alícuotas del cultivo se le agregaron cantidades crecientes de Novo ( $\Delta$ ) 1, ( $\times$ ) 2, ( $\bullet$ ) 5, ( $\blacksquare$ )  $10 \mu\text{g/ml}$  y (o) control sin agregado.

pendiente de incorporación que luego se hace similar a la del control; 2 µg/ml inhiben un 95% la síntesis de DNA a los 30 minutos p.i., pero quizás a tiempos mayores el sistema sea capaz de reiniciar la síntesis aunque con muy baja eficiencia; dosis mayores de 5 µg/ml no son necesarias y podrían provocar posibles efectos secundarios. En todos los experimentos que se detallan a continuación la dosis del antibiótico será 5 µg/ml.

#### Síntesis de RNA total

La síntesis de RNA total en *B. subtilis* 168M infectado con SPO1 silvestre a m.i. 10 fue medida por la incorporación de <sup>3</sup>HAdé adicionada 1 minuto post infección. A los 2 minutos p.i. a uno de los cultivos en paralelo se le agregó 5 µg/ml de Novo.

En la Figura 9A se muestra que el agregado del antibiótico afecta sólo parcialmente la síntesis de RNA total (40%), al menos durante los primeros 35 minutos luego de su agregado.

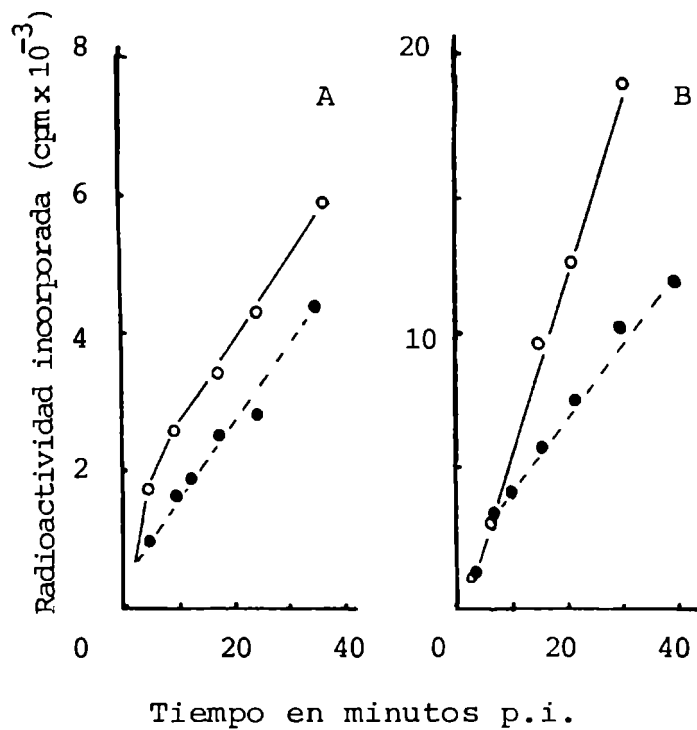
#### Síntesis de proteínas

En paralelo a la síntesis de DNA y RNA total medimos la síntesis de proteínas en *B. subtilis* 168M infectado con SPO1 silvestre a m.i. 10 por la incorporación de <sup>3</sup>HLeu adicionada al momento de la infección. A una alícuota del cultivo a los 2 minutos p.i. se le agregó 5 µg/ml de Novo.

Como se puede observar en la Figura 9B durante los primeros 7 minutos después del agregado de Novo no se aprecia inhibición, y luego comienza a caer la pendiente de incorporación de marca. A los 30 minutos p.i. la inhibición

Figura 9

Efecto de Novo sobre la síntesis de RNA total y proteínas en *B. subtilis* infectado con SP01 silvestre.



Medida de la incorporación de <sup>3</sup>HAdé (6 µg/ml y 17 µg/ml) en RNA total (A) y <sup>3</sup>HLeu (1.5 µCi/ml y 0.024 µg/ml) en proteínas (B) agregadas 1 minuto post-infección en *B. subtilis* 168M infectado con SP01(+) en ausencia (o) y presencia de 5 µg/ml de Novo (●) agregado a los 2 minutos p.i.. Las muestras fueron tomadas a distintos tiempos y procesadas según Materiales y Métodos.

fue del orden del 50% en presencia del antibiótico. Esta disminución de la incorporación de marca, como veremos más adelante, es atribuida a la carencia de los mRNAs tardíos, y ésta, a la ausencia de replicación.

c) NIVEL DE TRANSCRIPCION VIRAL EN *B. subtilis* 168M INFECTADO CON SPO1 SILVESTRE EN PRESENCIA DE NOVO

El nivel de transcripción viral se determinó por la hibridización a DNA de SPO1(+) de los RNAs marcados (<sup>3</sup>HRNAs). Estos RNAs fueron obtenidos por pulsos de marcación con uridina tritiada (28,6 µCi/ml y 0,2 µg/ml) a distintos tiempos post-infección según Materiales y Métodos. Como control empleamos a los <sup>3</sup>HRNAs obtenidos, en paralelo, en ausencia de Novo.

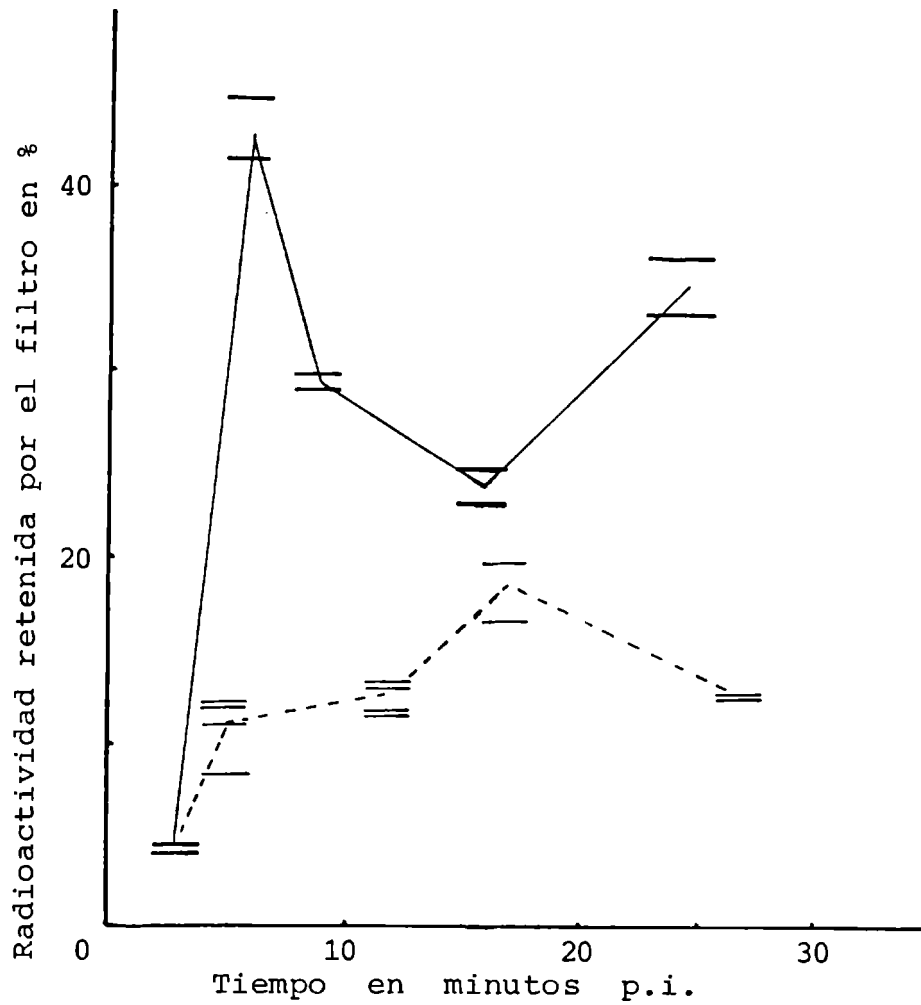
En la Figura 10 se puede observar el nivel de transcripción viral del bacteriofago silvestre en ausencia y presencia de Novo.

En ausencia del antibiótico se observa que la síntesis de RNA se inicia inmediatamente después de la infección (4,7% de hibridización entre los 1-3 minutos p.i.) y en un corto lapso de tiempo alcanza un máximo nivel de hibridización (entre los 5-7 minutos p.i.). Luego la curva muestra un valle entre los 8 a los 17 minutos p.i.; posteriormente el nivel de hibridización vuelve a aumentar. Estos resultados son concordantes con los ya descriptos (42, 43).

En presencia de Novo, entre los 4-6 minutos, no se ve el alto nivel de producción de RNAs esperado, sino que se observa tan sólo aproximadamente el 25% del valor hallado en ausencia de Novo. Entre los 11-13 y 16-18 minutos p.i. no

Figura 10

Nivel de transcripción viral del bacteriofago SP01(+) en presencia y ausencia de Novo.



Se midió la transcripción viral después de la infección de SP01 silvestre en *B. subtilis* 168M en ausencia (—) y presencia de 5 µg/ml de Novo (---) por la hibridización a DNA de SP01(+). Las barras indican el tiempo de marcación y cada una de ellas es una determinación.

| Tiempo de marcación<br>(minutos p.i.)               | Blanco en ausencia<br>de DNA (cpm) | RNA por tubo<br>(cpm) |
|---|------------------------------------|-----------------------|
| 1 - 3   | 6                                  | 6643                  |
| 4 - 6 *   | 13                                 | 3432                  |
| 5 - 7   | 21                                 | 5595                  |
| 8 - 10  | 17                                 | 4107                  |
| 11 - 13 *   | 21                                 | 7891                  |
| 15 - 17   | 11                                 | 6397                  |
| 16 - 18 *   | 18                                 | 8110                  |
| 25 - 28   | 18                                 | 3900                  |
| 26 - 28 *   | 16                                 | 3297                  |
| * <sup>3</sup> HRNAs obtenidos en presencia de Novo |                                    |                       |

observamos el valle característico del silvestre, aunque si analizamos a ese mismo tiempo la masa de RNA producidos, la diferencia entre ausencia y presencia del antibiótico es muy pequeña. A tiempos tardíos el fago silvestre, en presencia de Novo, no sólo no incrementa su nivel de hibridización, sino que produce menos RNAs que a tiempos medios.

#### d) PROGRAMA DE TRANSCRIPCION VIRAL

Para establecer la calidad de los RNAs sintetizados en presencia de Novo estudiamos la composición de cada uno de los <sup>3</sup>HRNAs utilizados en el ensayo anterior, mediante experimentos de hibridización-competición e hibridización-competición mezcla.

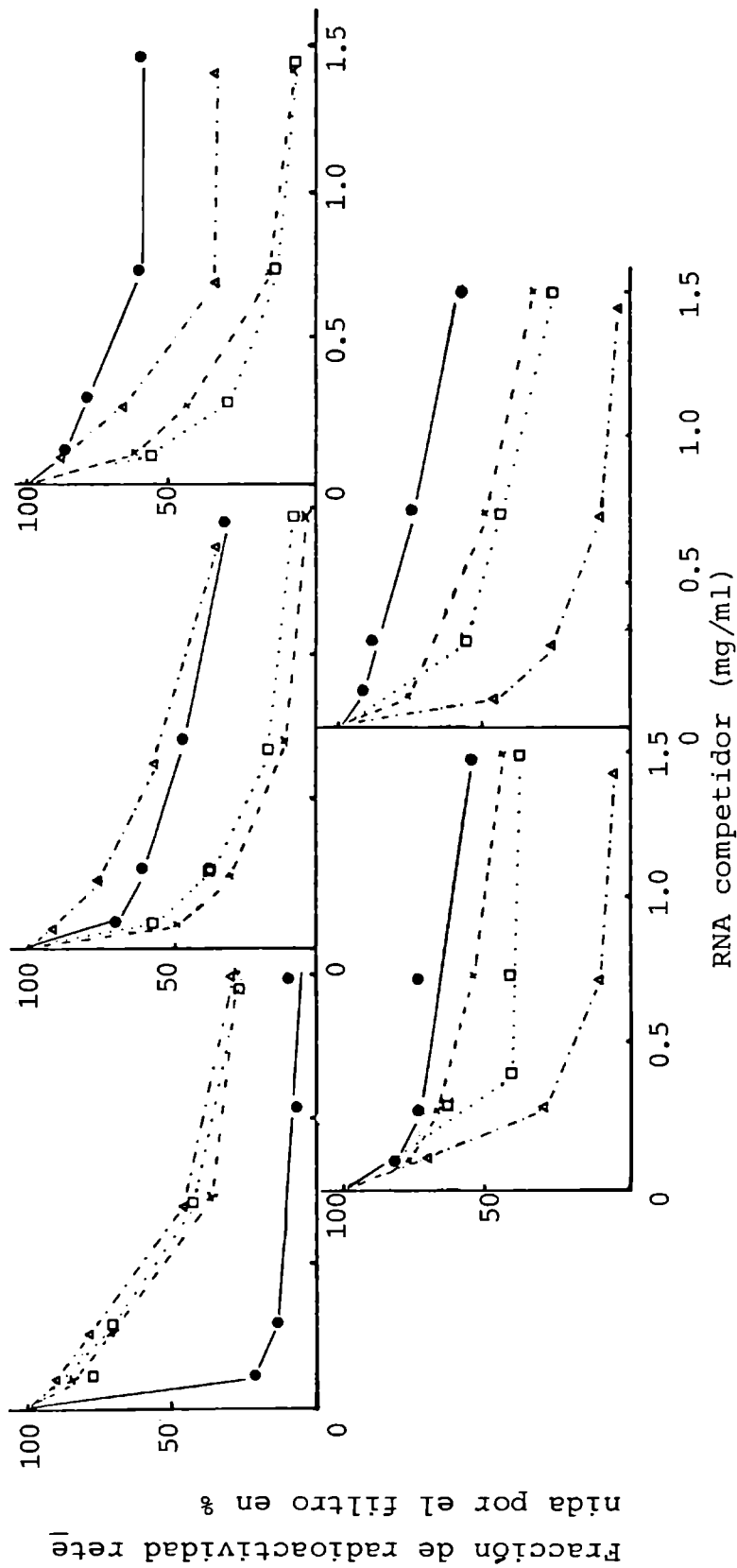
Se usaron como RNAs competidores a los RNA(+) Cm 12 min; RNA(+) 7 min; RNA(+) 10 min y RNA(+) 28 min (41, 42). En el Cuadro 1 se indican las clases de RNAs que posee cada competidor.

En la Figura 11 se puede observar la calidad, en clases, de los <sup>3</sup>HRNAs del fago silvestre en ausencia de Novo. De esta figura sólo haremos un rápido análisis ya que los resultados están en un todo de acuerdo con los ya descriptos (42, 43, 38, 5, 150). Entre el 1-3 minutos p.i. el RNA(+) Cm 12 min es capaz de competir un 94% de la marca. Esta es una competición máxima estimada y se obtiene extrapolando (a concentración cero del RNA competidor) la pendiente final de la curva obtenida a altas concentraciones de RNA competidor. El resto de los competidores usados compiten entre un 30 a un 50% de la marca.

Entre los 5 a 7 minutos se observa el freno de la



Figura 11



Programa de transcripción viral del bacteriofago silvestre al infectar *B. subtilis* 168M. Los RNAs marcados (0.2-0.4  $\mu\text{g/ml}$ ) fueron hibridizados a DNA de SPO1(+) (12  $\mu\text{g/ml}$ ) y competidos con RNA(+) Cm 12 min (o); RNA(+) 7 min (x); RNA(+) 10 min (□) y RNA(+) 28 min (Δ). <sup>3</sup>HRNAS (A) 1-3 min p.i.; (B) 5-7 min p.i.; (C) 8-10 min p.i.; (D) 15-17 min p.i. (E) 25-28 min p.i.

Figura 11  
(continuación)

| Tiempo de marcación<br>(min. p.i.) | Blanco en ausencia<br>de DNA (cpm) | RNA por tubo<br>(cpm) | Fracción de RNA que<br>hibridiza a DNA (%) |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|--|
| 1 - 3                              | 9                                  | 5987                  | 4.2  |
| 5 - 7                              | 19                                 | 11876                 | 42.7                                       |
| 8 - 10                             | 17                                 | 7476                  | 29.3                                       |
| 15 - 17                            | 64                                 | 13545                 | 23.6                                       |
| 25 - 28                            | 23                                 | 10987                 | 36.8                                       |

clase "e", ya que tanto RNA(+) 7 min como el RNA(+) 10 min compiten casi totalmente al  $^3$ HRNA, en cambio el RNA(+) Cm 12 min sólo lo compite un 61%. Entre los 8 a 10 minutos observamos el comienzo de la síntesis de los RNAs de la clase "m<sub>2</sub>l" debido a una mejor competición de RNA(+) 10 min que RNA(+) 7 min.

Entre los 15 y 17 minutos la síntesis de las clases "em" y "m" ya se halla frenada porque tanto RNA(+) Cm 12 min como RNA(+) 7 min son malos competidores.

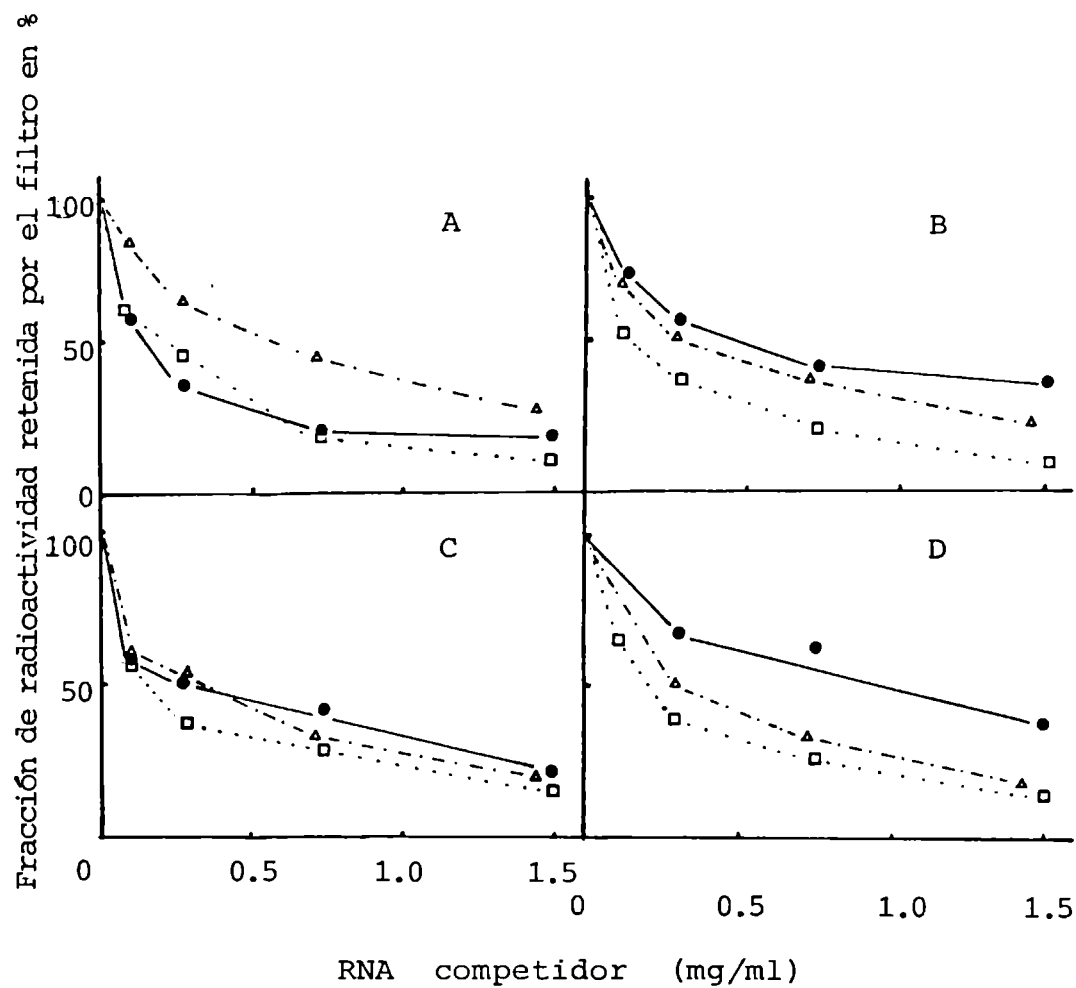
Entre los 25 a 28 minutos p.i. el RNA(+) 28 min es capaz de competir un 88% de la marca, en cambio el RNA(+) 10 min es capaz de competir un 65%.

En la Figura 12 se grafica la hibridización-competición de los  $^3$ HRNAs sintetizados en presencia de Novo, agregado a los 2 minutos p.i..

Entre los 4 a 6 minutos el RNA(+) Cm 12 min es aún capaz de competir un 80% de la marca, el RNA(+) 10 min es tan buen competidor como el RNA(+) Cm 12 min y el RNA(+) 28 min es capaz de competir un 28% de la marca. Esta competición tan alta por el RNA(+) 28 min podría hacernos pensar en una cierta inespecificidad de este competidor en especial.

Cuando analizamos al  $^3$ HRNA 11-13 min observamos que el RNA(+) Cm 12 min compite aún un 55% de la marca, el RNA(+) 10 min un 76% y el RNA(+) 28 min es capaz de competir un 51%. Entre los 15-18 minutos p.i. observamos que RNA(+) Cm 12 min todavía es capaz de competir un 46% de la marca, el RNA(+) 10 min un 63% y el RNA(+) 28 min un 57%. Cuando analizamos al  $^3$ HRNA 25-28 min observamos que el RNA(+) 10 min es mejor competidor que el RNA(+) 28 min (65 y 53% respectivamente) y el RNA(+) Cm 12 min es capaz de competir un 46% de la marca.

Figura 12



Programa de transcripción del fago silvestre crecido en presencia de Novo. Los RNAs (0.2 - 0.4  $\mu\text{g/ml}$ ) fueron hibridizados a 12  $\mu\text{g/ml}$  de DNA de SPO1(+) y competidos con RNA(+) Cm 12 min (O); RNA(+) 10 min ( $\square$ ) y RNA(+) 28 min ( $\Delta$ ).  $^3\text{H}$ RNAs (A) 4-6 min p.i.; (B) 11-13 min p.i.; (C) 16-18 min p.i. y (D) 26-28 min p.i.

| Tiempo de marcación<br>(min. p.i.) | Blanco en ausencia<br>de DNA (cpm) | RNA por tubo<br>(cpm) | Fracción de RNA que<br>hibridiza a DNA (%) |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|--|
| 4 - 6                              | 20                                 | 9576                  | 12.1                                       |
| 11 - 13                            | 26                                 | 6000                  | 13.1                                       |
| 16 - 18                            | 18                                 | 7446                  | 18.9                                       |
| 26 - 28                            | 18                                 | 3076                  | 12.4                                       |

El análisis de estos resultados nos permite decir que la síntesis de RNAs de clases tempranas no fue reprimida en presencia de Novo. Este comportamiento difiere del silvestre, sin Novo, en el cual los  $^3$ HRNAs 5-7 y 15-17 min p.i., como vimos, ya no poseían las clases "e" y "em", respectivamente. Además, el RNA(+) 10 min es mejor competidor que el RNA (+) 28 min, dándonos las bases para afirmar que en presencia del inhibidor no se transcribe la clase tardía "l".

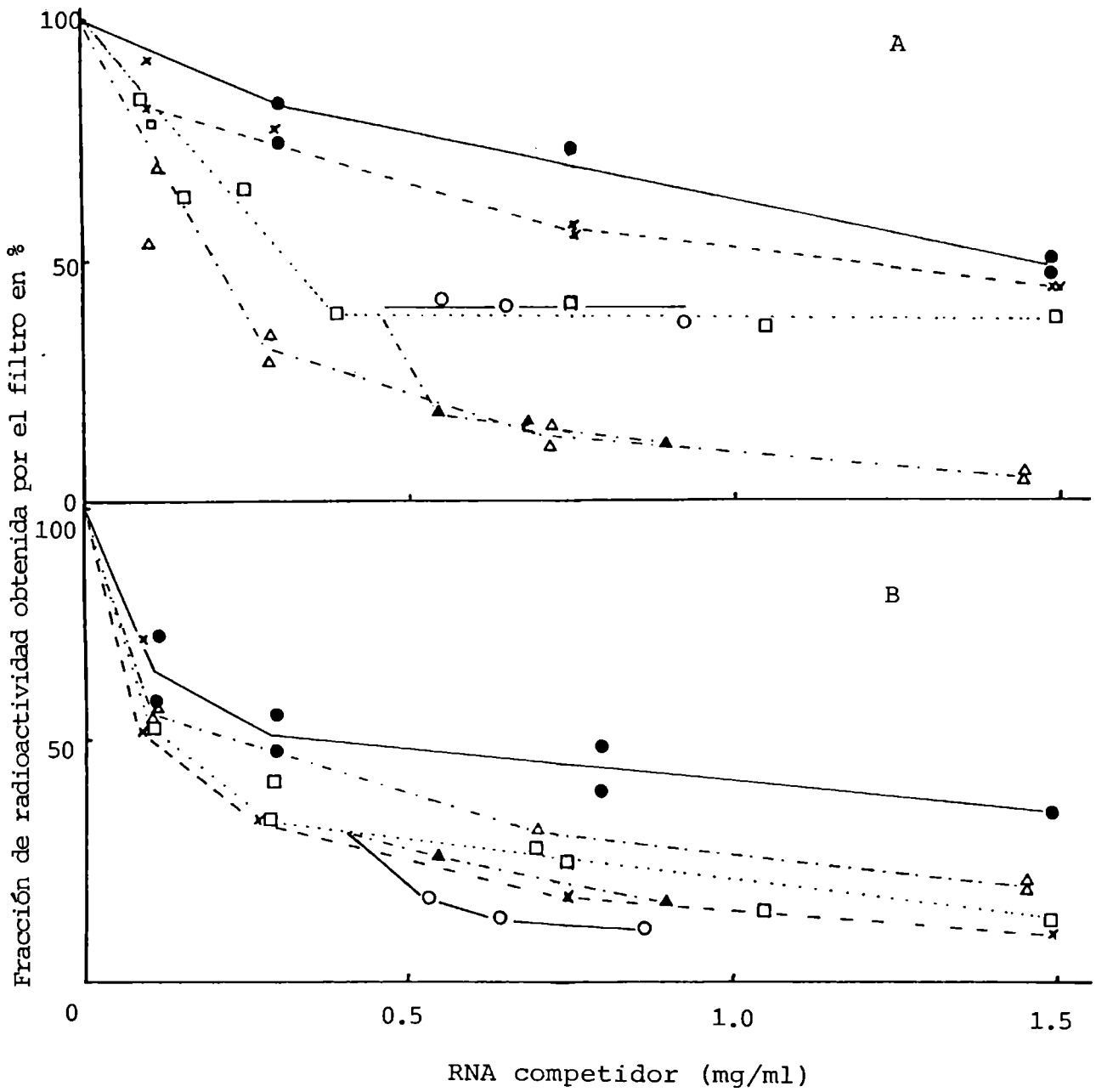
Con el objeto de reafirmar las observaciones antes enunciadas y analizar la síntesis de la clase tardía "m<sub>2</sub>l" hicimos experimentos de hibridización-competición mezcla con los  $^3$ HRNAs 15-17 min p.i. (sin Novo) y  $^3$ HRNAs 16-18 min p.i. (con Novo). Estos fueron competidos por RNA(+) Cm 12 min, RNA(+) 7 min, RNA(+) 10 min y RNA(+) 28 min. Como así también al RNA(+) 10 min (0,466 mg/ml) se le adicionaron cantidades crecientes de RNA(+) Cm 12 min o RNA(+) 28 min.

Si analizamos al  $^3$ HRNA 15-17 min (sin Novo) podemos ver (Figura 13A) que el RNA(+) Cm 12 min es tan sólo capaz de competir un 14% de la marca, el RNA(+) 7 min un 23%, el RNA(+) 10 min un 58% y el RNA(+) 28 min un 80% de la marca.

Si al competidor RNA(+) 10 min le agregamos cantidades crecientes de RNA(+) Cm 12 min no se observa incremento de la competición por la mezcla. En cambio, cuando le agregamos cantidades crecientes del RNA(+) 28 min vemos que la mezcla es capaz de competir del mismo orden que el RNA(+) 28 min. De esta experiencia podemos decir que a este tiempo no hay RNAs de clases tempranas y son transcriptos normalmente los RNAs de las clases tardías.

Si analizamos al  $^3$ HRNA 16-18 min p.i. obtenido en presencia de Novo (2 minutos p.i.) podemos ver (Figura 13B) que

Figura 13



Los <sup>3</sup>HRNAs 15-17 min p.i. (A) en ausencia y 16-18 min p.i. (B) en presencia de Novo, de los experimentos anteriores fueron hibridizados a DNA de SPO1(+) (17 µg/ml) y competidos con RNA(+) Cm 12 min (O); RNA(+) 7 min (x); RNA(+) 10 min (□) y RNA(+) 28 min (▲). El RNA(+) 10 min (0.466 mg/ml) fue mezclado con cantidades crecientes de RNA(+) Cm 12 min (o) o RNA(+) 28 min (▲).

el RNA(+) Cm 12 min compite un 40% de la marca, el RNA(+) 7 min un 74%, el RNA(+) 10 min un 75% y el RNA(+) 28 min es capaz de competir un 61% de la marca. Cuando al RNA(+) 10 min le agregamos cantidades crecientes de RNA(+) Cm 12 min es capaz de competir un 23% de la marca no competida por el RNA(+) 10 min y cuando le adicionamos cantidades crecientes del RNA(+) 28 min éste compite con igual pendiente final que el RNA(+) 10 min, y del mismo orden que el RNA(+) 7 min. De estos resultados podemos inferir que todavía se están sintetizando RNAs de clases tempranas "e" y "em" y que no hay RNAs de clases tardías.

La ausencia de clase "l" se demostró por la menor competición de 28 min que 10 min y la carencia de RNAs de clase "m<sub>2</sub>l" por una competición del mismo orden de los RNA (+) 10 min, RNA(+) 10 min + RNA(+) 28 min y el RNA(+) 7 min.

#### DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Novobiocina, en dosis de 5 µg/ml, por inactivación de la DNA girasa, inhibe la síntesis de DNA de *B. subtilis* 168M en un 99%. En esas condiciones la síntesis de RNA es escasamente afectada durante los primeros 25 minutos p.i., pero a tiempos mayores parece frenarse. Este efecto podría explicarse si la RNA pol no fuese capaz de reconocer sus promotores en el DNA bacteriano que hubiese perdido sus supergiros negativos. Recientemente Yang y col. (196) utilizando un sistema libre de células con transcripción-traducción acoplada observaron que ciertos genes eran dependientes de un determinado estado conformacional, superenrollado negativamente, del DNA. Además, hechos similares han sido

observados en células eucariotes; Lescure y col. (82) han demostrado que Novo inhibe la transcripción por la RNA pol II de timo bovino o de germen de trigo.

En presencia de Novo, a tiempos tempranos, la síntesis de proteínas no parece ser afectada pero sí lo es a tiempos mayores; este efecto se puede atribuir lógicamente a un menor monto de mRNAs o rRNAs.

Una vez analizados los efectos del antibiótico sobre *B. subtilis* 168M, se lo infectó con el bacteriofago silvestre SP01(+). Cuando medimos la síntesis de DNA viral en presencia del antibiótico, observamos que la misma dosis que inhibe la replicación bacteriana lo hace también sobre la viral. El agregado de Novo sólo afecta parcialmente la síntesis de RNA total (40%) durante los primeros 35 minutos p.i.. La síntesis de proteínas es escasamente afectada durante los primeros 15 minutos p.i. para inhibirla hasta un 60% a tiempos mayores. Este efecto lo podemos atribuir a que la síntesis de proteínas bacterianas está normalmente frenada por el fago y la viral lo está a causa del acople replicación-transcripción ya que en presencia de Novo no hay replicación ni transcripción viral tardía.

Aunque se ha prestado principal atención a los cambios conformacionales de los DNAs circulares, tanto en replicación como en transcripción, los DNAs lineales (SP01), tal como habíamos supuesto, también requieren una DNA topoisomerasa II activa. Como en los DNAs circulares, la rotación de los DNAs lineales dentro de la célula debe encontrarse restringida. Por ello, en estos últimos el mantenimiento de un DNA superenrollado negativamente puede ser funcionalmente significativo. Ha sido descripto que el bacteriofago



T7, de *E. coli*, es incapaz de sintetizar su DNA (lineal) en presencia de Cou (estrechamente relacionado con Novo) (66). Al analizar el nivel de transcripción viral en presencia de Novo observamos que se hallaba alterado y disminuído. Este hecho nos indujo a querer establecer la calidad de los <sup>3</sup>HRNAs transcriptos.

En la Tabla 4 se pueden observar claras diferencias con respecto al programa de transcripción viral del fago silvestre, en ausencia de Novo. La primera es que la presencía de RNAs tempranos es aún significativa a tiempos tardíos. Se podría suponer que la transcripción de los RNAs tempranos cesara a causa del cambio conformacional que sufre el DNA por la acción de la SPO1 topoisomerasa. La inhibición de la acción de esta enzima por Novo impediría el superenrollado negativo del DNA y por consiguiente su capacidad para producir el bloqueo de las clases tempranas.

La configuración relajada del DNA que resultaría de la carencia de actividad de la enzima podría resultar en:

- a) El mantenimiento de la capacidad de la RNA pol bacteriana para reconocer los promotores tempranos.
- b) La imposibilidad de que se sinteticen algunos mRNAs que codifiquen para factores de bloqueo de las clases tempranas.
- c) La falta de reconocimiento por rho u otro factor similar de los sitios de atenuación .

La hipótesis (a) implicaría la existencia de promotores cuyas cualidades para su reconocimiento por la DNA pol dependen del estado de superenrollamiento del DNA. Al respecto Sanzey (149) ha observado, en *E. coli*, que ciertos promotores son transcriptos en presencia de una DNA girasa

Tabla 4

| <sup>3</sup> HRNAs                 | Clases de RNAs   |               |                |
|------------------------------------|------------------|---------------|----------------|
| Tiempo de marcación<br>(min. p.i.) | Tempranas<br>(%) | Medias<br>(%) | Tardías<br>(%) |
| 5 - 7                              | 48 **            | 52 **         | 0 **           |
| 4 - 6 *                            | 80               | 20            | 0              |
| 8 - 10                             | 38               | 45            | 17             |
| 11 - 13 *                          | 55               | 45            | 0              |
| 15 - 17                            | 0                | 43            | 57             |
| 16 - 18 *                          | 45               | 55            | 0              |
| 25 - 27                            | 0                | 36            | 64             |
| 26 - 28 *                          | 30               | 70            | 0              |

\* <sup>3</sup>HRNAs obtenidos tras el agregado de 5 µg/ml de Novo a los 2 minutos p.i.

\*\* Los porcentajes fueron estimados de los experimentos de hibridización-competición.

inactiva mientras que otros no lo son. Se ha demostrado la necesidad de la acción de la DNA girasa para la transcripción en PM2 (137, 138), en el fago N4 y en el micobacterio fago I3 (104).

La hipótesis (b) resulta improbable por las siguientes observaciones: el gen/es responsable/es del freno de estas dos clases tempranas debe ser transcrito como un mRNA temprano, al menos para la clase "e", o temprano-medio para "em". Teniendo en cuenta que se produce síntesis de RNAs tempranos y medios los mensajeros para estos bloqueadores debieran poseer propiedades especiales que no les permitieran su síntesis en presencia de Novo.

Con respecto a la hipótesis (c) en SP01-*B. subtilis* se desconocen los controles tanto de la terminación como de la atenuación de la transcripción viral. Se ha demostrado que ciertas moléculas de RNA se unen al atenuador del operón triptofano de *E. coli*, y a sitios en el genoma de T7 y Lambda (4) formando un globo o "loop" que impediría que la transcripción progrese. Al estar el DNA relajado, por la presencia de Novo, estas moléculas no reconocerían al atenuador y la transcripción se podría llevar a cabo.

La hipótesis (a) resulta más atrayente por ser la más económica pero no tenemos evidencias para descartar a la hipótesis (c).

Los RNAs de las clases medias no parecen ser afectados, y además el freno de los RNAs de la clase "m" parece llevarse a cabo normalmente. Ya entre los 26-18 minutos p.i. en presencia de Novo parece no haber especies "m" porque a ese tiempo tanto los RNA(+) 7 min, RNA(+) 10 min y RNA(+) 10 min + RNA(+) 28 min compiten con la misma pendiente final.

En estas condiciones se nos presenta la duda sobre quién es el responsable del cese de esta clase de RNAs, ya que en estas condiciones, presencia de Novo, no existe replicación ni transcripción viral tardía, eventos éstos a los cuales se les atribuía la función de bloqueo. Sin embargo, podemos suponer que gp33-gp34 han sido transcriptos y que éstos al modificar a la RNA pol, por sí mismos, pueden frenar la síntesis de los mRNAs de la clase "m".

Al inhibir a la SPO1 topoisomerasa no se observa transcripción viral tardía ("m<sub>2</sub>l" y "l"). Este efecto puede ser atribuido ya sea a la ausencia de replicación o como en la propuesta (a) a la necesidad de supergiros negativos del DNA para el reconocimiento de promotores tardíos.

Con respecto a la primera hipótesis diversos autores han presentado evidencias sobre el acople entre la replicación y la transcripción viral tardía (38, 151). En el próximo capítulo el nombrado acople será tratado más en detalle. Por las evidencias que poseemos no podemos descartar una acción directa del cambio en el estado de superenrollamiento sobre la transcripción viral tardía. Recientemente De Wynaert y Hinkle (27) en el bacteriofago T7 han demostrado (hecho compartido por ambas hipótesis) que la replicación y la transcripción viral tardía se encuentran inhibidas cuando la DNA girasa es inactiva.

En resumen, considerando en conjunto los resultados presentados en este capítulo proponemos que sería necesario un cierto estado topológico para bloquear a la síntesis de los RNAs transcriptos por la RNA pol bacteriana, que los RNAs de las clases medias o son transcriptos de dominios que permanecen superenrollados (70a), o que los RNAs

transcriptos por la RNA pol modificada por el gp28 son independientes de la estructura terciaria del DNA y por último que se requiere un DNA enrollado negativamente y una activa síntesis de DNA para que la RNA pol modificada por los gp33 y gp34 pueda reconocer a los promotores tardíos.

### C A P I T U L O    I I I

## I. ESTUDIOS DE TRANSCRIPCION VIRAL TARDIA EN MUTANTES DEFICIENTES EN REPLICACION

### a) CARACTERIZACION GENETICA DE LOS MUTANTES DEFICIENTES EN REPLICACION

Los mutantes letales condicionales de tipo supresible del bacteriofago SP01 han sido agrupados inicialmente por ensayos de complementación en 36 cistrones (115). Se ha confeccionado un mapa genético, lineal, mediante cruza de dos y tres puntos y en él se han ubicado 34 de los cistrones. Los mutantes de los dos cistrones restantes presentaban frecuencias de recombinación muy altas con cualquiera de los representantes de los otros cistrones, hecho por el cual fueron ubicados en ambos extremos del mapa, recientemente descrito como redundante (57, 123).

Los mutantes representantes de los cistrones 21 a 23 y 27 a 32 son deficientes en replicación (DO). Es un hecho frecuente en diversos bacteriofagos que cistrones con un mismo fenotipo estén ubicados en una zona discreta del mapa.

Utilizando endonucleasas de restricción, Eco R1 u otras, se fragmentó al DNA y por un lado se buscaron los posibles promotores y sus productos, y por otro lado los fragmentos obtenidos se hibridizaron a mRNAs conocidos. A través de esas técnicas, Chem y col. (24) observaron que los cistrones 20 a 28 se hallaban entre las posiciones 84 a 91 Kpb, y que los cistrones 27 y 28 estaban localizados entre las posiciones 89 a 91 Kpb (25). No se ha precisado

aún con exactitud la posición de los cistrones 29 a 32 en el mapa físico (46) si bien se puede imaginar la posición de alguno de ellos.

#### Complementación en medio sólido

Las complementaciones se llevaron a cabo, según Materiales y Métodos, sobre bacterias no supresoras ( $Su^-$  cepa 168M) empleando a representantes en los diferentes cistrones DO.

Para contar con controles adecuados complementamos, en las condiciones antes indicadas, a mutantes pertenecientes a un mismo cistrón (control negativo) y a mutantes en cistrones diferentes. Además, cada uno fue controlado en forma individual en condiciones permisivas ( $Su^+$ ).

Los resultados obtenidos con los controles fueron los esperados (115). Las complementaciones entre mutantes del mismo cistrón fueron negativas, mientras que las realizadas entre mutantes de distintos cistrones fueron positivas. Es decir que los mutantes en un mismo cistrón son incapaces de desarrollar sobre una cepa no supresora (y sí lo hacen sobre la supresora) y los mutantes en cistrones diferentes cuando coinfectan a una bacteria  $Su^-$  sus funciones se complementan y dan progenie.

#### b) CARACTERIZACION FENOTIPICA

##### Síntesis de DNA en *B. subtilis* infectado con el bacteriofago silvestre o mutantes DO

La síntesis acumulativa de DNA en *B. subtilis* 168M ( $Su^-$ ) infectado con SP01(+) o distintos mutantes DO se midió por la



incorporación de adenina tritiada en material álcali estable precipitable por TCA. Las muestras se procesaron según Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la Figura 14, y en coincidencia con lo mostrado en los capítulos anteriores, el bacteriofago silvestre presenta una activa acumulación de marca después de los 10 minutos p.i., hecho no observado en los mutantes. Si lo analizamos a tiempos mayores (30 minutos p.i.), observamos que los DO no llegan a incorporar más de un 5% de la radioactividad incorporada por el silvestre a ese mismo tiempo.

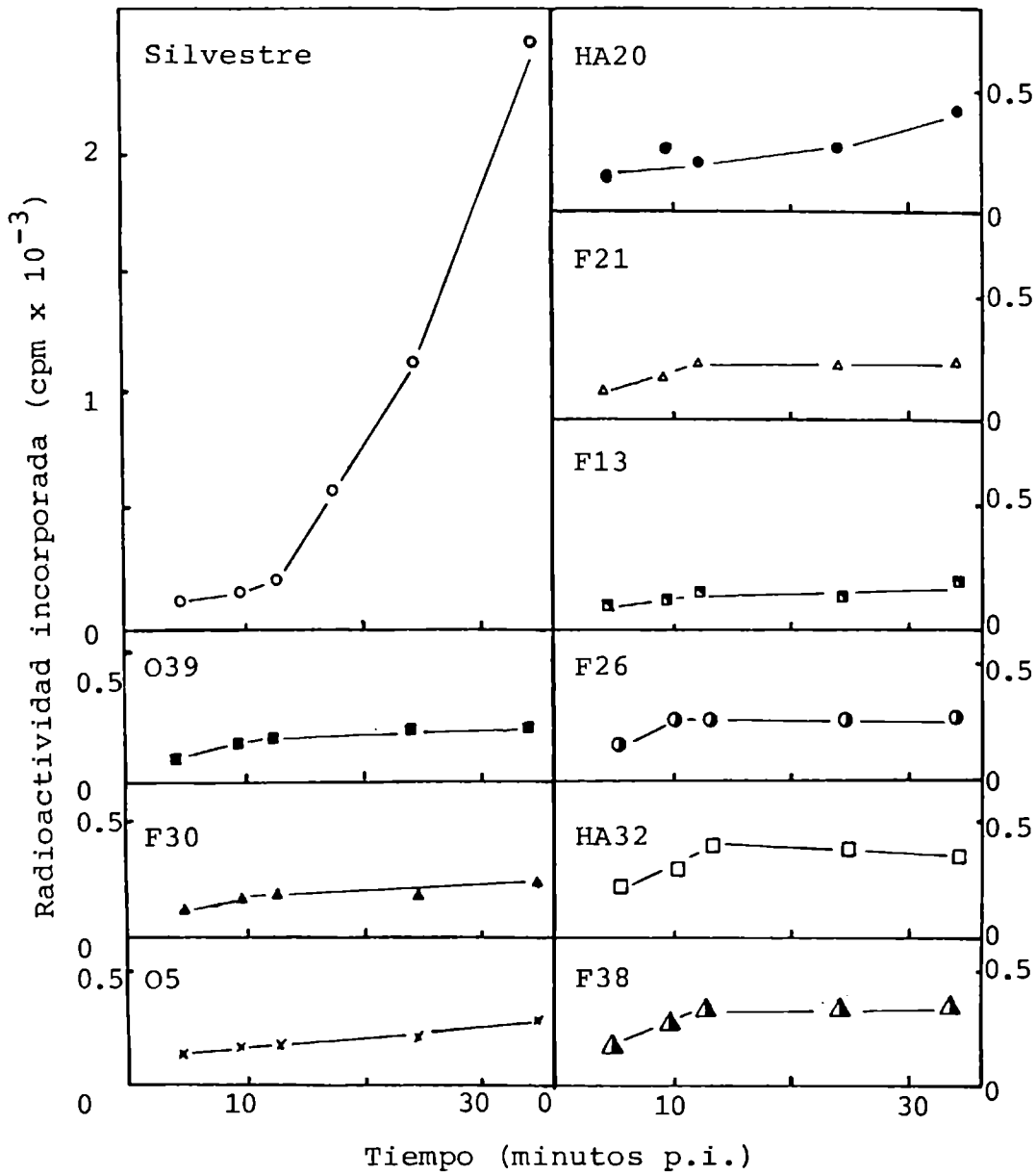
Los mutantes representantes de los cistrones 21, 22, 23 y 29, parecerían ser incapaces de iniciar la replicación, aunque en el sistema *B. subtilis*-SP01 se desconoce si las proteínas iniciadoras son o no codificadas por el fago. Con respecto a los cistrones 23 y 29, su no incorporación inicial se debería a que éstos están involucrados en la biosíntesis de 5-hidroximetiluracilo y la degradación de timina respectivamente, y supuestamente sin ellos no podría ser sintetizado ni el cebador. De los cistrones 21 y 22 es poco lo que se conoce; el primero también estaría involucrado en la iniciación, pero el segundo intervendría en la elongación (55). De este último, como ya hemos dicho, se han descrito tres proteínas diferentes (136). En todos los casos, en los que se analizó el acople del gen 22, se ha trabajado con un solo mutante, hecho éste que hace difícil el arribar a una conclusión.

#### Síntesis de RNA total en *B. subtilis* infectado con SP01 silvestre o con mutantes DO

La síntesis de RNA total en *B. subtilis* 168M infectado

Figura 14

Síntesis de DNA en *B. subtilis* infectado con SPO1(+) o con mutantes DO



Medida de la incorporación de adenina tritiada ( $6 \mu\text{Ci/ml}$  y  $17 \mu\text{g/ml}$ ) agregada 1 minuto post-infección.

Las muestras fueron procesadas según Materiales y Métodos.

El porcentaje de bacterias no infectadas fue de aproximadamente 0.2%.

con SP01 silvestre o con mutantes D0 se midió por la incorporación de adenina tritiada en material álcali lábil precipitable por TCA. Las muestras se procesaron según Materiales y Métodos.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos, como el porcentaje de la marca acumulada en el silvestre y en el mutante D0, a dos tiempos (10 y 25 minutos p.i.), a los cuales se les resta un tiempo inicial (5 minutos p.i.), ya que este primer valor medido puede incluir transcripción bacteriana.

La síntesis de RNA total en algunos casos fue mayor, y en otros menor que lo observado en el silvestre.

#### Nivel de transcripción viral

Para estudiar la producción de RNAs codificados por el bacteriofago silvestre o los mutantes D0 determinamos la fracción de radioactividad (<sup>3</sup>HRNAs) que hibridiza a DNA de SP01 a distintos tiempos después de la infección. Para ello preparamos, tal como se indica en Materiales y Métodos, RNAs marcados por pulsos de 2 a 3 minutos con uridina tritiada.

En la Tabla 6, columna A, se observa que entre los 4 a 7 minutos p.i. el fago silvestre transcribe un 34% del RNA total sintetizado a ese tiempo. Los dos mutantes analizados del cistrón 29 que, como vimos en la Tabla 5, presentaban una baja proporción de RNA total, presentan un alto nivel de transcripción viral, del mismo orden que el silvestre. Podemos decir que la ausencia de su gp29 activo podría producir un mayor bloqueo que en el silvestre sobre la síntesis de RNA bacteriano, quizás por acumulación de algún producto responsable de tal freno, aunque aún tal función no ha sido

Tabla 5

Síntesis de RNA total en bacterias infectadas con SP01 silvestre o con diferentes mutantes DO.

| Mutante        | Gen | Síntesis de RNA total % |             |
|----------------|-----|-------------------------|-------------|
|                |     | 10 min p.i.             | 25 min p.i. |
| SP01 silvestre | -   | 100                     | 100         |
| O39            | 21  | 120                     | 119         |
| F30            | 22  | 62                      | 85          |
| O5             | 23  | 108                     | 111         |
| HA20           | 27  | 119                     | 150         |
| F21            | 28  | 88                      | 79          |
| F13            | 29  | 35                      | 47          |
| F26            | 30  | 112                     | 87          |
| HA32           | 31  | 119                     | 95          |
| F38            | 32  | 106                     | 103         |

Se infectó un cultivo de *B. subtilis* (m.i. 10) con el bacteriofago en cuestión y se agregó  $^3\text{HAdE}$  (6  $\mu\text{Ci/ml}$  y 17  $\mu\text{g/ml}$ ) a los 2 minutos post-infección.

Los resultados se expresan como el porcentaje de radioactividad incorporada a tiempos 10 minutos p.i. y 25 minutos p.i., menos la incorporación a 5 minutos, en material álcali lábil precipitable por ácido, con respecto al cultivo infectado con SP01 silvestre.

La radioactividad incorporada por el bacteriofago silvestre a los 5 minutos p.i. fue de 980 cpm, a los 10 minutos p.i. 1580 cpm y a los 25 minutos p.i. 2450 cpm. Con respecto a lo incorporado por los mutantes a los 5 minutos p.i. fue de: O39: 781 cpm; F30: 885 cpm; O5: 1132 cpm; HA20: 2348 cpm; F21: 1733 cpm; F13: 987 cpm; F26: 1981 cpm; HA32: 1780 cpm y F38: 1880 cpm.

Tabla 6

Nivel de transcripción viral a distintos tiempos en bacterias infectadas con SP01 silvestre o con mutantes D0.

| Bacteriofago | Cistrón | <sup>3</sup> HRNA 4-7 min A | <sup>3</sup> HRNA 25-28 min B | $\frac{B}{A} \times 100$ C | $\frac{A \text{ mutante}}{A \text{ silvestre}} \times 100$ D | $\frac{B \text{ mutante}}{B \text{ silvestre}} \times 100$ E |
|--------------|---------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|--|--|
| Silvestre    | -       | 34 % $\pm$ 3 (8)            | 42 % $\pm$ 8 (11)             | 123                        | 100  | 100  |
| O39          | 21      | 11 % $\pm$ 2.8(8)           | 4 % $\pm$ 1 (8)               | 36                         | 32   | 9.5  |
| F30          | 22      | 15 % $\pm$ 0.5(8)           | 3.3% $\pm$ 0.5 (7)            | 22                         | 44   | 7.8  |
| O5           | 23      | 11 % $\pm$ 1.4(8)           | 1.7% $\pm$ 0.6 (8)            | 16                         | 32   | 4.0  |
| HA20         | 27      | 1.7% $\pm$ 0.5(6)           | 0.38% $\pm$ 0.08(5)           | 22                         | 5  | 0.9  |
| F21          | 28      | 10 % $\pm$ 2 (4)            | 0.42% $\pm$ 0.09(4)           | 4.2                        | 29   | 1.0  |
| F13          | 29      | 51 % $\pm$ 5 (4)            | 8 % $\pm$ 2.5 (8)             | 16                         | 150  | 19.0   |
| HA21         | 29      | 29 % $\pm$ 4 (4)            | 5 % $\pm$ 0.4 (4)             | 17                         | 85   | 12.0   |
| F26          | 30      | 25 % $\pm$ 1 (4)            | 3.3% $\pm$ 0.5 (4)            | 13                         | 74   | 7.8  |
| HA32         | 31      | 16 % $\pm$ 5 (7)            | 2 % $\pm$ 1.4 (8)             | 12                         | 47   | 4.7  |
| F38          | 32      | 12 % $\pm$ 6 (8)            | 3 % $\pm$ 1.4 (8)             | 25                         | 35   | 7.1  |

Determinación del nivel de transcripción viral del bacteriofago silvestre y de los mutantes D0 al infectar *B. subtilis* 168M a 37°C en medio líquido. Los RNAs marcados fueron hibridizados con 12 µg/ml de DNA desnaturalizado de SP01.

En las columnas A y B los resultados se expresan como el porcentaje de radioactividad hibridizada a DNA de SP01, éstos son valores medios  $\pm$  D.S. y entre paréntesis se expresa el número de determinaciones.

Columna C: se presenta la relación entre la transcripción viral tardía/temprana.

Columnas D y E: se presenta la relación entre el nivel de transcripción viral de cada mutante con respecto al silvestre a un mismo tiempo.

descripta.

Con excepción del mutante del cistrón 27, que presenta un nivel de transcripción muy bajo, el resto de los mutantes presentan un nivel de transcripción entre un 30 a un 75% de lo observado en el silvestre (Tabla 6, columna D).

Cuando hibridizamos a DNA los <sup>3</sup>HRNAs 25-28 min (Tabla 6, columna B) observamos que el bacteriofago silvestre presenta un nivel del orden descrito en bibliografía (42). Los mutantes representantes de los cistrones 27 y 28 presentaron un nivel de transcripción viral tardío, 100 veces menor que el silvestre. El producto del cistrón 28 (gp28), como ya hemos dicho, es el responsable de modificar a la RNA polimerasa bacteriana para transcribir los RNAs virales de clases medias (29, 30, 121, 122, 81). Pero del gp27 es poco lo que se conoce. Más adelante, un mutante en este cistrón será analizado en detalle.

El mutante O5, representante del cistrón 23, presentó un nivel de transcripción casi 20 veces menor que el silvestre. A tiempos tardíos, el resto de los mutantes presentaron un nivel de transcripción viral entre 5 a 10 veces menor que el bacteriofago silvestre a esos mismos tiempos. De los mutantes DO podemos decir que, si bien con distinto grado, algunos de sus RNAs transcriptos a tiempos tardíos no se expresan, o la totalidad lo hacen en escaso grado.

En la columna C de la Tabla 6 se puede apreciar que la relación transcripción viral tardía sobre transcripción temprana es menor en todos los mutantes con respecto al silvestre. Esto nos indica que el nivel de transcripción viral temprana no es mantenido por los mutantes a tiempos tardíos. La disminución observada es extrema en el mutante F21

(representante del cistrón 28), tal como se ha indicado en bibliografía (38).

En la Tabla 6, columna E, se observa que los mutantes presentan un nivel de transcripción viral aproximadamente 10 veces menor que el presentado por el silvestre. De éstos, los mutantes del cistrón 29 presentan una relación algo mayor. Quizás esto se deba a un remanente del alto nivel observado a tiempos tempranos.

#### Programa de transcripción viral

Los  $^3$ HRNAs de los experimentos anteriores fueron analizados por ensayos de hibridización-competición. Se utilizaron los siguientes RNAs competidores: RNA(+) Cm 12 min, RNA(+) 7 min, RNA(+) 10 min y RNA(+) 28 min (para la composición de estos RNAs, ver Introducción, Cuadro 1).

Al  $^3$ HRNA 4-7 min p.i., llamado aquí temprano, lo competimos con el RNA(+) Cm 12 min y RNA(+) 7 min, y al  $^3$ HRNA 25-28 min con RNA(+) 10 min y RNA(+) 28 min.

Analizando los ensayos de hibridización-competición del  $^3$ HRNA del fago silvestre (Figura 15) se observa que el RNA(+) Cm 12 min es capaz de competir un 32% de la marca. Como ya dijimos en el capítulo anterior, ésta es una competición máxima estimada y se obtiene extrapolando (a concentración cero del RNA competidor) la pendiente final de la curva de hibridización-competición obtenida a altas concentraciones del RNA competidor.

Cuando se lo compete con el RNA(+) 7 min se observa que éste es un buen competidor, o sea que ya a ese tiempo se frenó la síntesis de los RNAs de la clase temprana "e".

En la Figura 15 se presentan las curvas de hibridización

Figura 15

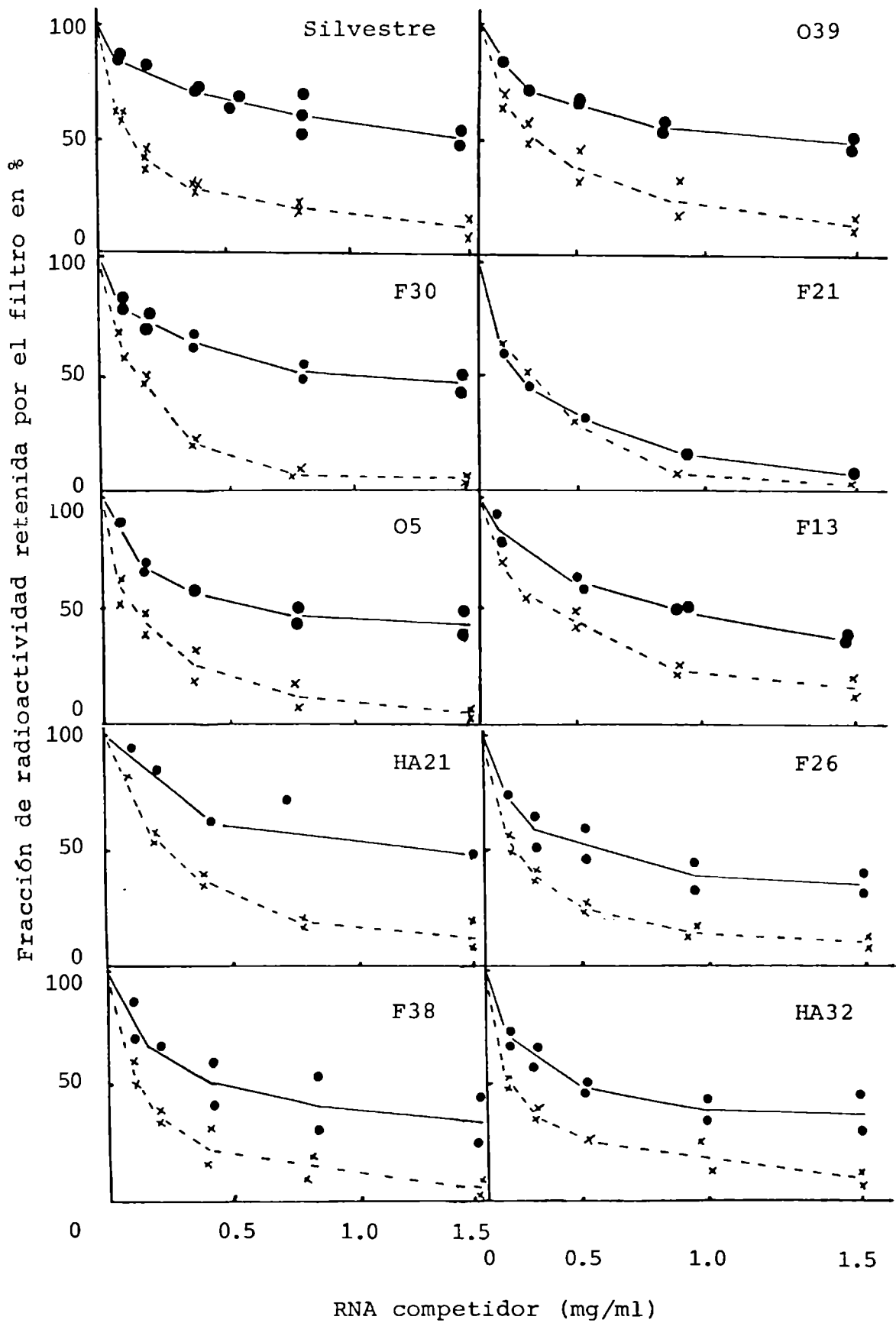




Figura 15  
(Continuación)

Hibridización-competición de los  $^3\text{H}$  RNAs 4-7 min p.i. del bacteriofago silvestre o de los mutantes DO. Estos RNAs marcados (0.1-0.2  $\mu\text{g/ml}$ ) fueron hibridizados a DNA de SP01 (+) (12  $\mu\text{g/ml}$ ) según Materiales y Métodos. Los RNAs competidores usados fueron RNA(+) Cm 12 min (●) y RNA(+) 7 min (×).

| Bacteriofago | Blanco en ausencia de DNA (cpm) | RNA por tubo (cpm) | Fracción de radio actividad que hibridiza a DNA (%) |
|--------------|---------------------------------|--------------------|---|
| Silvestre    | 8                               | 1839               | 34.8  |
| O39          | 7                               | 6879               | 12  |
| F30          | 13                              | 7940               | 16.5  |
| O5           | 18                              | 12168              | 10.4  |
| F21          | 26                              | 7784               | 11.7  |
| F13          | 14                              | 6306               | 54.3  |
| HA21         | 26                              | 8276               | 29.9  |
| F26          | 16                              | 5418               | 24.3  |
| HA32         | 17                              | 9839               | 12.4  |
| F38          | 18                              | 7651               | 7.3   |

competición de los distintos mutantes D0 a tiempos tempranos. Como ya se expresó anteriormente, al mutante HA20 (representante del cistrón 27) se lo analizará posteriormente en más detalle.

Si analizamos al  $^3\text{HRNA}$  25-28 min p.i. del bacteriofago silvestre (Figura 16) competido con el RNA(+) 10 min, se observa que éste es capaz de competir un 44% de la marca y el RNA(+) 28 min compite un 89% de la marca. O sea que a este tiempo se estarían transcribiendo sólo las clases " $m_1l$ ", " $m_2l$ " y " $l$ ". Esto es coincidente con lo observado en bibliografía (42, 43). En la Figura 16 se presentan las curvas de hibridización-competición de los distintos mutantes D0. Para un mejor y más fluído análisis de los resultados de los experimentos arriba presentados, los dividimos en cuatro grupos (Tabla 7) de acuerdo al RNA competidor usado.

Los  $^3\text{HRNA}$  4-7 min de los mutantes ensayados, al usar al RNA(+) Cm 12 min, se pueden agrupar en: los que son competidos de manera similar, o algo más, que el silvestre (representantes de los cistrones 21, 22, 23, 29 y 32) y los que son competidos casi el doble que el silvestre (representantes de los cistrones 28, 30 y 31).

Analizando los  $^3\text{HRNAs}$  anteriores, al usar al RNA(+) 7 min como competidor, en todos los casos, se observa que éste compite más que el RNA(+) Cm 12 min. En el fago silvestre tal aumento de competición se atribuye al cese de la síntesis de los RNAs de la clase "e" y al comienzo de la síntesis de las clases medias. En los mutantes defectivos en replicación podríamos decir que el cese de la clase "e" ocurre normalmente. Al menos hay fuertes evidencias en dos de los mutantes descriptos (5, 115). Aunque, como ya dijimos, este efecto puede ser tan solo atribuible al comienzo de la

Figura 16

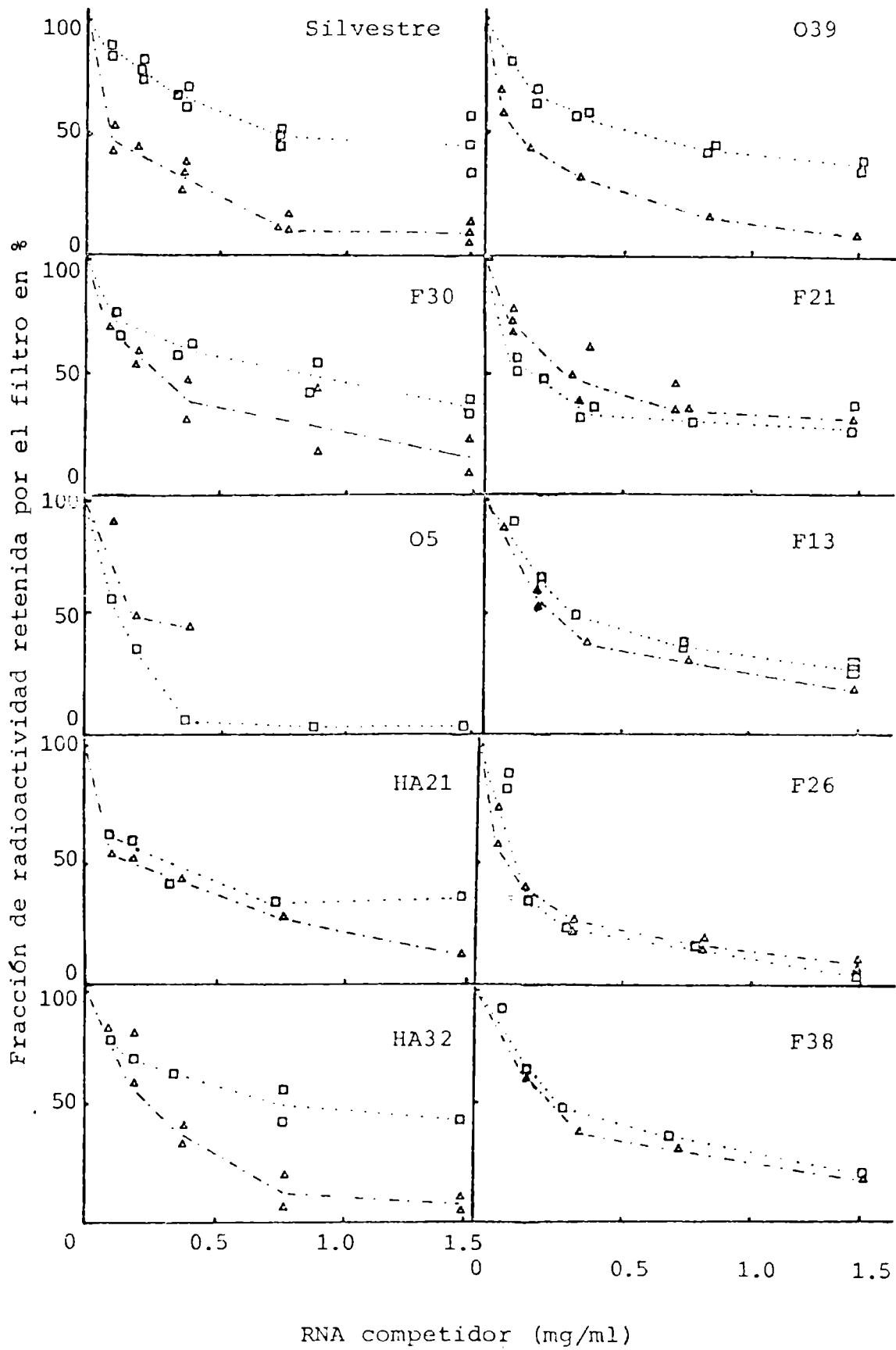


Figura 16  
(Continuación)

Hibridización-competición de los  $^3$ HRNAs 25-28 min p.i. del bacteriofago silvestre o de los mutantes DO. Estos RNAs marcados (0.1-0.2  $\mu$ g/ml) fueron hibridizados a DNA de SP01 (+) (12  $\mu$ g/ml) según Materiales y Métodos.

Los RNAs competidores usados fueron RNA(+) 10 min (□) y RNA(+) 28 min (Δ).

| Bacteriofago | Blanco en ausencia de DNA (cpm) | RNA por tubo (cpm) | Fracción de radio actividad que hibridiza a DNA (%) |
|--------------|---------------------------------|--------------------|---|
| Silvestre    | 24                              | 3779               | 44.7  |
| O39          | 24                              | 7802               | 3.8   |
| F30          | 20                              | 8388               | 3.3   |
| O5           | 13                              | 7624               | 1.8   |
| F21          | 15                              | 8312               | 0.4   |
| F13          | 18                              | 6426               | 9.4   |
| HA21         | 29                              | 6887               | 5.1   |
| F26          | 15                              | 10414              | 3.8   |
| HA32         | 14                              | 4628               | 1.8   |
| F38          | 13                              | 6342               | 2.1   |

Tabla 7

Hibridización-competición de los  $^3\text{HRNAs}$  4-7 min y 25-28 min p.i. con distintos RNAs competidores

| Fago      | $^3\text{HRNA}$ 4 - 7 min p.i. |                 | $^3\text{HRNA}$ 25 - 28 min p.i. |                 |
|-----------|--------------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------|
|           | RNA(+) Cm 12 min               | RNA(+) 7 min    | RNA(+) 10 min                    | RNA(+) 28 min   |
| silvestre | 32 <sup>*</sup>                | 76 <sup>*</sup> | 44 <sup>*</sup>                  | 84 <sup>*</sup> |
| O39       | 47                             | 74              | 59                               | 80              |
| F30       | 42                             | 83              | 58                               | 66              |
| O5        | 54                             | 77              | 65                               | 57              |
| HA20      | 76                             | 97              | 86                               | 78              |
| F21       | 76                             | 82              | 98                               | 54              |
| F13       | 41                             | 68              | 54                               | 73              |
| HA21      | 39                             | 83              | 67                               | 57              |
| F26       | 59                             | 81              | 76                               | 74              |
| HA32      | 65                             | 82              | 54                               | 74              |
| F38       | 49                             | 77              | 51                               | 61              |

\* Porcentaje de competición determinado extrapolando (a concentración cero del competidor) la pendiente final de la curva de competición obtenida a altas concentraciones del RNA competidor.

síntesis de los RNAs de las clases "m" y "m<sub>1</sub>l".

El análisis de los <sup>3</sup>HRNAs competidos por el RNA(+) 10 min indica que en todos los casos hay una mayor competición que en el silvestre, pudiéndolos dividir en los que son competidos un poco más que el silvestre (representantes de los cistrones 21 a 23, 29, 31 y 32) y los que presentan una competición próxima al doble (mutantes de los cistrones 28 y 30).

Cuando utilizamos al RNA(+) 28 min como competidor observamos dos grupos: el primero formado por los mutantes que presentan un porcentaje próximo al silvestre y mayor que el del RNA(+) 10 min, formado por los representantes de los cistrones 21 y 31, y el segundo formado por aquéllos que presentan un porcentaje menor o igual que el silvestre pero del mismo orden que el RNA(+) 10 min, los mutantes representantes de los cistrones 22, 23, 28, 29, 30 y 32.

#### DISCUSION DE LOS RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos por ensayos de complementación podemos decir que los mutantes analizados presentaron mutaciones supresibles en cistrones independientes. Por experimentos de incorporación de precursores radioactivos fueron deficientes en síntesis de DNA; Además las bacteriofagos infectados eran capaces de mantener una activa síntesis de RNA total.

Los niveles de transcripción viral a tiempos tempranos fueron de alrededor de un 30% con respecto a lo observado en el silvestre con excepción de los mutantes del cistron 29, donde observamos un nivel, de RNAs transcriptos, igual o

mayor que el silvestre. Estos mutantes, por algún mecanismo no bien conocido, producen una mayor represión sobre los RNAs transcriptos por la célula huésped, ya que como podemos observar en la Tabla 5 hay una menor incorporación de marca en RNA total y un incremento en el nivel de transcripción por el bacteriofago.

Si observamos los niveles de transcripción a tiempos tardíos podemos decir que todos los mutantes analizados presentaron una muy escasa síntesis de RNAs, 10 veces menos que el silvestre, o, como en el caso de los mutantes de los cistrones 27 y 28, 100 veces menos.

En la Tabla 6, columna E, se puede observar que con excepción del mutante F13 (representante del cistrón 29), cuyo gen codifica a la enzima dUMP hidroximetilasa, que presentó un porcentaje entre el 12 al 19%, el resto de los mutantes presentaron un nivel de transcripción viral, con respecto al silvestre, deprimido más de 10 veces. Aunque mutantes en el cistrón (29), al igual que el gp42 de T4 (codifica para la CMP hidroximetilasa) podrían tener más de un rol (175, 53). Quizás esta diferencia pueda ser sólo atribuida a que aún a tiempos tardíos, por un desfase temporal, existiesen RNAs residuales de las clases medias.

Para dilucidar este interrogante se analizó al mutante HA21, representante del mismo cistrón, y en éste esas diferencias con el resto de los mutantes parecerían no existir.

De los resultados analizados podemos decir que en ausencia de replicación el nivel de transcripción viral tardía es muy bajo, efecto éste que atribuimos a la existencia de acople entre la replicación y la transcripción viral tardía.

Analizando los experimentos de hibridización-

competición podemos observar que hay mutantes que comparten grupos comunes, como los mutantes representantes de los cistrones 21, 22, 23, 29 y 32, con respecto a los competidores RNA(+) Cm 12 min, RNA(+) 7 min y RNA(+) 10 min. Estos presentan porcentajes de competición próximos a los que presenta el silvestre.

El otro grupo común está formado por los mutantes de los cistrones 28 y 30, también con respecto a los mismos RNAs competidores, pero éstos presentan un porcentaje del doble o próximo a él, con respecto al porcentaje presentado por el silvestre. En otras palabras, los representantes del primer grupo parecerían presentar, si bien en una cantidad de masa menor, cualitativamente todas las clases de RNAs que presenta el silvestre a tiempos tempranos y medios, y éstas frenarían su síntesis "al mismo tiempo" que el silvestre. Si bien en todos ellos parecería haber una mayor cantidad de RNAs de clases tempranas.

Con respecto al segundo grupo podríamos decir que en estos mutantes existe una mayor transcripción de los RNAs de las clases tempranas, o simplemente un mayor porcentaje alternativamente de uno u otro según el ciclo viral.

Del mutante del cistrón 28 (F21), del cual se conoce su función, podemos decir que la alta competición por el RNA(+) Cm 12 min fue debida al no inicio de la síntesis de los RNAs de las clases medias y la mayor competición del RNA(+) 7 min fue atribuída al freno de la síntesis de la clase "e". En otras palabras el mutante F21 entre los 4 a 7 min p.i. sólo transcribe RNAs de la clase "em".

Del mutante del cistrón 30 es poco lo que se conoce, pero con estos resultados podemos decir que tendríamos una



mayor transcripción de RNAs tempranos, posiblemente un nivel de medios "normal" y ausencia de RNAs tardíos. Por nuestro diseño experimental no podemos saber si este mutante presenta el bloqueo de las clases tempranas o no, ni afirmar si el nivel de RNAs medios es normal.

Hay dos mutantes que podrían ponerse dentro de este grupo, pero sus efectos no son tan claros: son el mutante HA21, representante del cistrón 29, y el mutante del cistrón 31. Cuando analizamos los ensayos de hibridización-competición de los <sup>3</sup>HRNAs 25-28 min, y en especial al usar al RNA(+) 28 min como competidor observamos dos grupos, los que presentan proporciones similares al silvestre (los mutantes en los cistrones 21, un representante del cistrón 29, F13 y 31) y el resto de los mutantes por otro lado, con un porcentaje menor que SP01(+) y del mismo orden que el RNA(+) 10 min.

Del mutante en el cistrón 21 podemos decir que por experimentos de hibridización-competición no existen diferencias porcentuales con respecto a los observados con el silvestre pero el mutante tan solo está transcribiendo un 10% de los RNAs transcriptos por el silvestre a tiempos tardíos. Glassberg y col. (55), han descripto que éste estaría directamente involucrado en la iniciación. Quizás en este mutante el acople replicación-transcripción se encuentre relajado.

De los dos mutantes que restan, F13 y HA32, ha sido demostrado (5) que, a tiempos tardíos, no transcribían a los RNAs de la clase "m<sub>2</sub>l" y sí lo hacían con la "l". Nosotros con el HA21, otro mutante representante del mismo cistrón que F13, demostramos que éste no transcribía RNAs de las clases tardías. En otras palabras, con respecto al cistrón 29, que el acople no sea claro es un efecto atribuible al mutante

pero en HA32, representante del cistrón 31, quizás se encuentren relajados algunos mRNAs pertenecientes a la clase "1".

El resto de los mutantes presenta un mayor o casi igual porcentaje de competición del RNA(+) 10 min con respecto al RNA(+) 28 min. Este hecho nos permite decir que al menos no hay transcripción de los RNAs de la clase "1", ya que, por nuestro diseño experimental, no podemos hacerlo extensivo a la clase " $m_2$ 1". Aunque, con los conocimientos actuales, conocer este último punto sería más una curiosidad que una necesidad científica porque el acople queda demostrado por la ausencia de los RNAs de la clase "1".

Dentro de este grupo tenemos a los mutantes en los cistrones 22, 23, 28, 29 (HA21), 30 y 32. De estos mutantes se sabe que gp23 codifica a dCMP deaminasa (155), enzima involucrada en la biosíntesis de hmU, que gp28 codifica una proteína reguladora de la transcripción de los RNAs de las clases medias, y que gp29 codifica, como ya hemos dicho, una enzima capaz de hidroximetilar al uracilo. De la función codificada por el cistrón 30 es poco lo que se conoce, al igual que de los gp22 y 32. Del primero podemos decir que se encuentra subdividido en tres; por otro lado es concebible pensar que el mutante F26 pueda presentar un efecto polar. Además, Reeve ha demostrado que al menos dos de los mutantes descriptos para el mismo cistrón codifican polipéptidos de distinto peso molecular (136). De los mutantes en los cistrones 22 y 32 podemos decir que el primero estaría involucrado en la elongación y el gp32 intervendría en la iniciación y también en la terminación.

Nuestros resultados son, con respecto al cistrón 22, coincidentes con los de Fujita y col. (38) ya que ellos

también observaron ausencia de transcripción tardía.

Estos hechos nos permiten afirmar la relación directa entre la ausencia de síntesis de DNA y la escasa o nula síntesis de RNAs de clases tardías.

En otros sistemas, bacteriofago T4-*E. coli*, se ha demostrado que en ausencia de replicación no se transcriben o lo hacen en muy pequeña escala los RNAs virales tardíos (11, 12, 140, 141). La síntesis de mRNAs tardíos, en T4, requiere un DNA temple competente y ese estado de competencia "inestable" estaría dado por la continua replicación (140). Ahora bien, cuando los gp30 (DNA ligasa) y gp46 (exonucleasa) son inactivos el modelo de "competencia" se mantiene y por ende hay transcripción tardía. En otras palabras, en ausencia de síntesis de DNA y de los gp30 y gp46 no existe acople entre la replicación y la transcripción viral tardía (141).

Es poco lo que se conoce en bibliografía sobre el acople replicación transcripción viral tardía en el bacteriofago SP01, pero parecería que la intensidad del acople varía de un gen a otro. Además, no es tan simple su análisis. Por ejemplo, Sarachu y col. han observado que en condiciones de síntesis de DNA inhibida la transcripción viral residual, a tiempos tardíos, es incrementada por un aumento de la multiplicidad de infección (151).

Stewart y col. (162) han demostrado que un mutante defectivo en replicación del bacteriofago SP82, estrechamente relacionado con SP01 (123), en condiciones de síntesis de DNA inhibida, es capaz de sintetizar un 25% con respecto al silvestre, de una proteína antigénica de cubierta y lisozima (162). Ahora bien, no fue claramente establecido si esta proteína antigénica fuese transcripta tardíamente, aunque quizás

este efecto pueda llegar a deberse a un problema en el dosaje de los genes.

Fujita y col. (38) usando algunos mutantes de SP01, deficientes en replicación, hallaron en un mutante del cistrón 22 una selectiva inhibición de la clase "1", no así de la "m<sub>2</sub>1". Por un camino totalmente independiente, Talkington y Pero (169) por análisis de Southern (164), no hallaron en otro mutante del mismo cistrón tal diferencia. Ahora bien, si las dos clases de RNAs ("m<sub>2</sub>1" y "1") son transcriptas por la misma enzima, no está claro la selectividad del acople, tal cual lo describieron Fujita y col. (38). Heinz y Shub (61) han hallado (en un mutante DO) dos de las proteínas correspondientes a las postuladas clases tardías. Esas aparecen después que otras proteínas tardías, pero en este DO el grado de síntesis de estas otras proteínas se halla disminuído (61). Por otro lado, Parker (119) ha descrito que en condiciones de replicación inhibida la síntesis de proteínas es estructurales está muy disminuída y casi no se ensamblan viriones. Como se puede deducir de lo presentado, la información al respecto es incompleta y algo contradictoria, pero aún así si en nuestro diseño existiera transcripción viral tardía, en ausencia de replicación, ésta sería muy escasa.

No es tan simple poder dilucidar este interrogante ya que no es posible transcribir y traducir "in vitro" algunos genes usando DNA de mutantes, porque éstos presentan un patrón bastante parecido al silvestre (154); ni tampoco analizar las proteínas producidas "in vivo" en *B. subtilis* infectado con el silvestre o mutantes DO, ya que no hay suficiente freno ni de la síntesis de RNAs ni de proteínas de la célula huésped por el bacteriofago (120), aunque es posible reconocer algunas de

las proteínas virales.

Quizás utilizando un sistema de células "anucleadas" minicells (135), transcribiendo y traduciendo "in vivo" puedan llegar a dilucidarse los eventos tempranos. Pero como el sistema SP01 silvestre-minicells es incapaz de dar progenie (134) nos hace pensar que los sistemas reguladores podrían estar relajados y además al no sintetizarse DNA en esas condiciones sería imposible intentar interpretar el acople replicación-transcripción viral tardía, ya que no tendríamos un control positivo.

## II. ESTUDIOS DE TRANSCRIPCION VIRAL EN EL MUTANTE HA20

Como ya hemos expresado al comentar la Tabla 6, hay dos mutantes que se diferencian claramente del resto y son los representantes de los cistrones 27 y 28. De este último se conoce claramente cuál es su rol así que no redundaremos en mayores análisis (56, 6). Pero del mutante HA20 (único mutante supresible descrito representante del cistrón 27) es poco lo que se conoce. Es defectivo en replicación (115) y con defectos en su programa de transcripción viral tardía (46). Además, se conocen dos mutantes de temperatura sólo defectivos en transcripción (54, 55).

### a) COMPLEMENTACION

Anteriormente se habían presentado resultados de complementación en medio sólido; ahora bien, como los cistrones 27 y 28 se encuentran muy próximos en el mapa físico (25), son transcriptos a tiempos tempranos y sólo se ha encontrado, en esa zona, un promotor temprano, es de interés establecer el grado de polaridad que pudieran presentar. Para ello se hizo una complementación en medio líquido del par de mutantes HA20 (cistrón 27) y F21 (cistrón 28) con el objeto de cuantificar este efecto. Complementamos como se describe en Materiales y Métodos, al par HA20-F21 coinfectando a *B. subtilis* 168M a m.i. 10 e infectando a la misma cepa con cada uno de ellos a la misma m.i.. La complementación del par fue positiva, con un rendimiento de 7,8 fagos por centro infectado y los

controles (mutantes por separado) no presentaron, tal como era esperado, producción de fagos; el rendimiento de éstos fue del orden del blanco experimental.

b) NIVEL DE TRANSCRIPCION

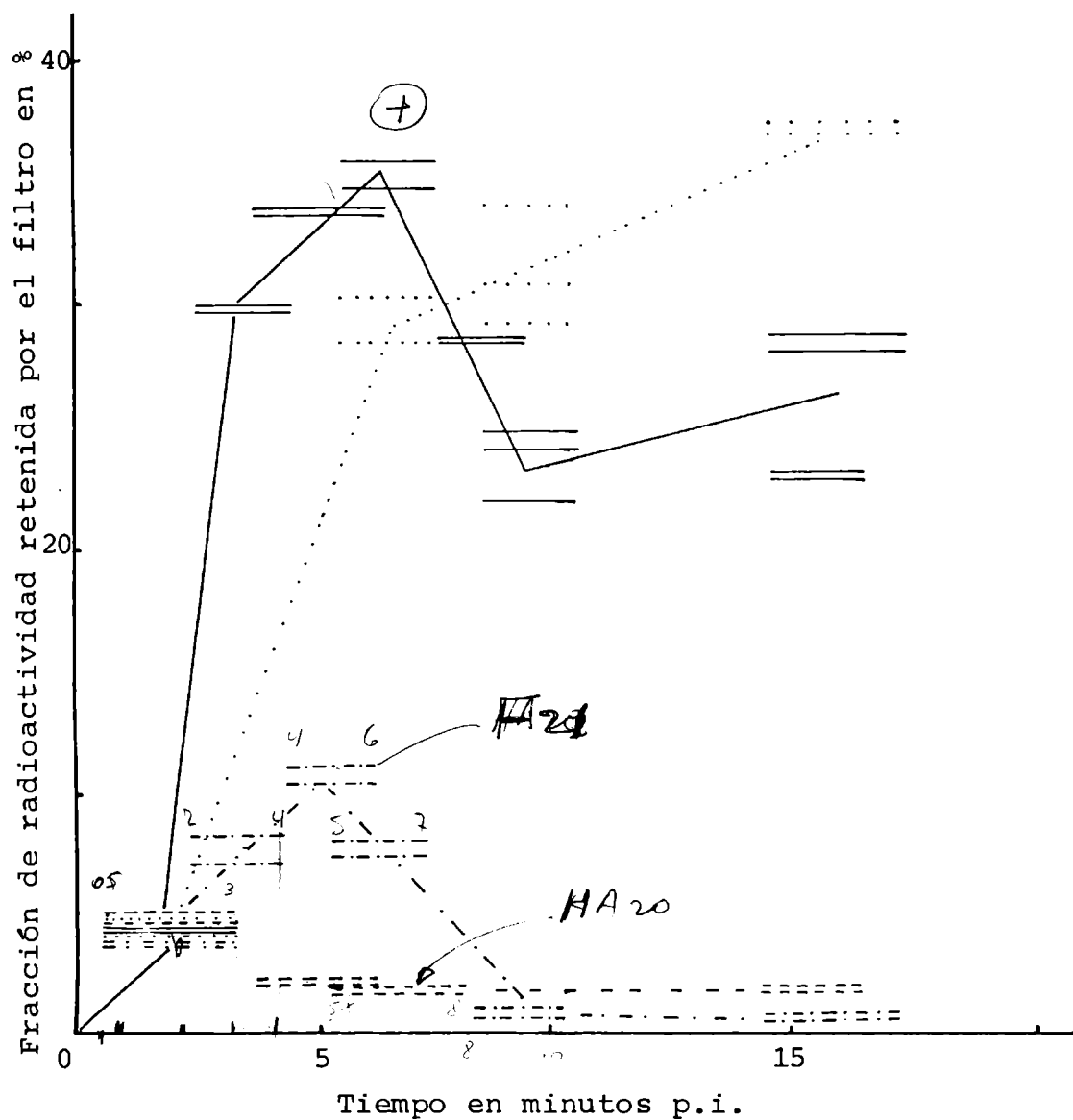
Para poder estudiar su programa de transcripción preparamos RNAs marcados por pulsos con uracilo tritiado (como se indica en Materiales y Métodos) a distintos tiempos después de la infección, y determinamos la fracción de radioactividad que hibridiza a DNA de SP01. Como controles empleamos a los <sup>3</sup>HRNAs del bacteriofago silvestre realizados en paralelo.

Como se observa en la Figura 17(y como ya se ha mostrado) el nivel de transcripción viral del bacteriofago silvestre se incrementa rápidamente desde el primer minuto hasta el séptimo post-infección y luego decae, presentando un valle entre el octavo y el décimo minuto. Esta disminución es sólo temporaria, dado que a partir de dicho momento la producción de RNAs aumenta hasta alcanzar un valor máximo, 42%. El mutante HA20, procesado en iguales condiciones, comienza a transcribir con niveles normales pero después de los 4 minutos p.i. el nivel de transcripción decae bruscamente para llegar a niveles 100 veces menores que el silvestre a tiempos tardíos. El mutante F21 presenta un patrón bastante similar, pero su nivel comienza a caer después de los 7 minutos.

Cuando analizamos el nivel de transcripción del par HA20-F21, éste parecería tener un patrón casi normal hasta los 8 minutos; a tiempos mayores no presentaba el valle

Figura 17

Nivel de transcripción viral del bacteriofago silvestre, HA20, F21 y HA20-F21



Se midió la transcripción viral después de infectar a 168M con el fago en cuestión a m.i. 10 por hibridización a DNA de SP01(+) (17  $\mu\text{g/ml}$ ). Silvestre (—); HA20 (-.-); F21 (---) y HA20-F21 (....).



pero producía un alto nivel de RNAs virales. Además, estos resultados reafirman lo observado por complementación.

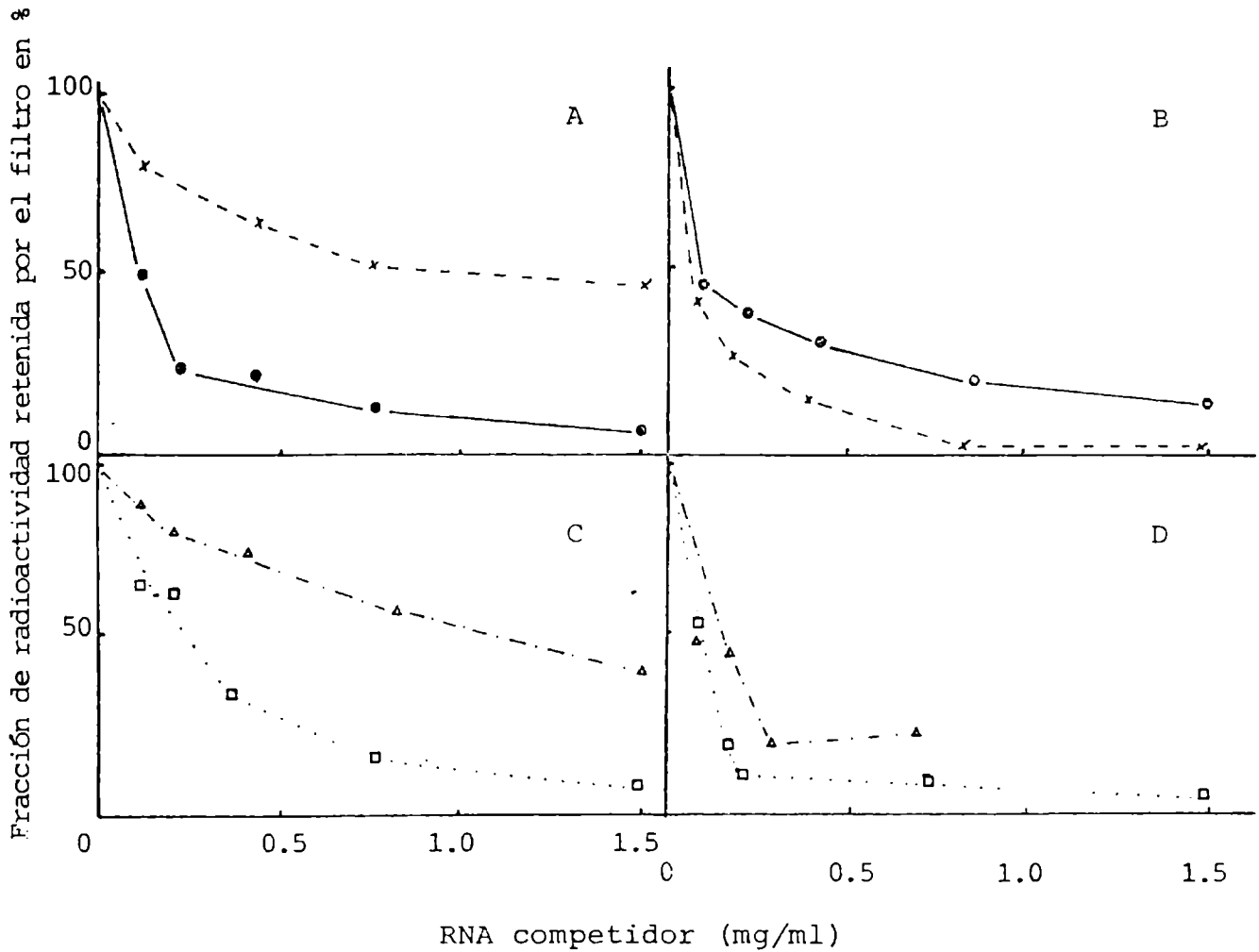
c) PROGRAMA DE CLASES DE RNAs

Para estudiar la producción de RNAs codificados por el mutante HA20 se realizaron una serie de experimentos de hibridización-competición e hibridización-competición mezcla. Para tal análisis se emplearon los  $^3$ HRNAs de los experimentos anteriores, los cuales fueron competidos con RNA(+) Cm 12 min; RNA(+) 7 min; RNA(+) 10 min y RNA(+) 28 min (Ver Introducción, Cuadro 1).

De acuerdo con los datos obtenidos y graficados en la Figura 18, podemos ver que entre los 2-4 min p.i. el RNA(+) Cm 12 min es capaz de competir un 84% de la marca, mientras que el RNA(+) 7 min sólo compite un 45%. Entre los 4-7 min se invierte el porcentaje de competición y es mejor competidor el 7 min con un 96% de la marca y el RNA(+) Cm 12 min compite un 76% de la marca. El  $^3$ HRNA 15-17 min p.i. fue competido un 75% por el RNA(+) 10 min, mientras que lo fue escasamente por el RNA(+) 28 min (28%), y a tiempos tardíos, 25-28 min p.i., sigue siendo mejor competidor el 10 min (86%) que el RNA(+) 28 min (78%).

De los resultados presentados hasta aquí podemos decir que: podría haber sido bloqueada la síntesis de RNAs de clase "e" porque entre los 5-7 min compite el 7 min totalmente a la marca y mejor que el RNA(+) Cm 12 min, si bien podría atribuir esta mayor competición tan sólo al inicio de la síntesis de las clases medias. Pero, recientemente ha sido descrito que este mutante frena su síntesis de RNAs

Figura 18



Programa de transcripción viral del bacteriofago mutante HA20 2-4 min p.i. (A); 4-7 min p.i. (B); 15-17 min p.i. (C) y 25-28 min p.i. (D). La hibridación-competición fue llevada a cabo según Materiales y Métodos. Los RNAs competidores usados fueron RNA(+) Cm 12 min (●); RNA(+) 7 min (x); RNA(+) 10 min (○) y RNA(+) 28 min (Δ).

| Tiempo de marcación<br>(min p.i.) | Blanco en ausencia<br>de DNA (cpm) | RNA por tubo<br>(cpm) | Fracción de radio-<br>actividad que hi-<br>bridiza a DNA (%) |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------|--|
| 2 - 4                             | 76                                 | 32516                 | 7.1  |
| 4 - 7                             | 21                                 | 6623                  | 2.1  |
| 15 - 17                           | 50                                 | 10929                 | 2.2  |
| 25 - 28                           | 61                                 | 19839                 | 0.43   |

tempranos normalmente (46). La síntesis de RNAs de clase "1" no parece iniciarse, ya que tanto entre los 15-17 min y 25-28 min p.i. el RNA(+) 10 min compite mejor que el 28 min.

Si reanalizamos la Figura 17, podemos ver que después de los 4 minutos p.i. el nivel de transcripción es muy bajo, por ende, los RNAs transcriptos a tiempos medios serían muy escasos y las especies " $m_2l$ " y "1" no se sintetizarían aún a tiempos tardíos.

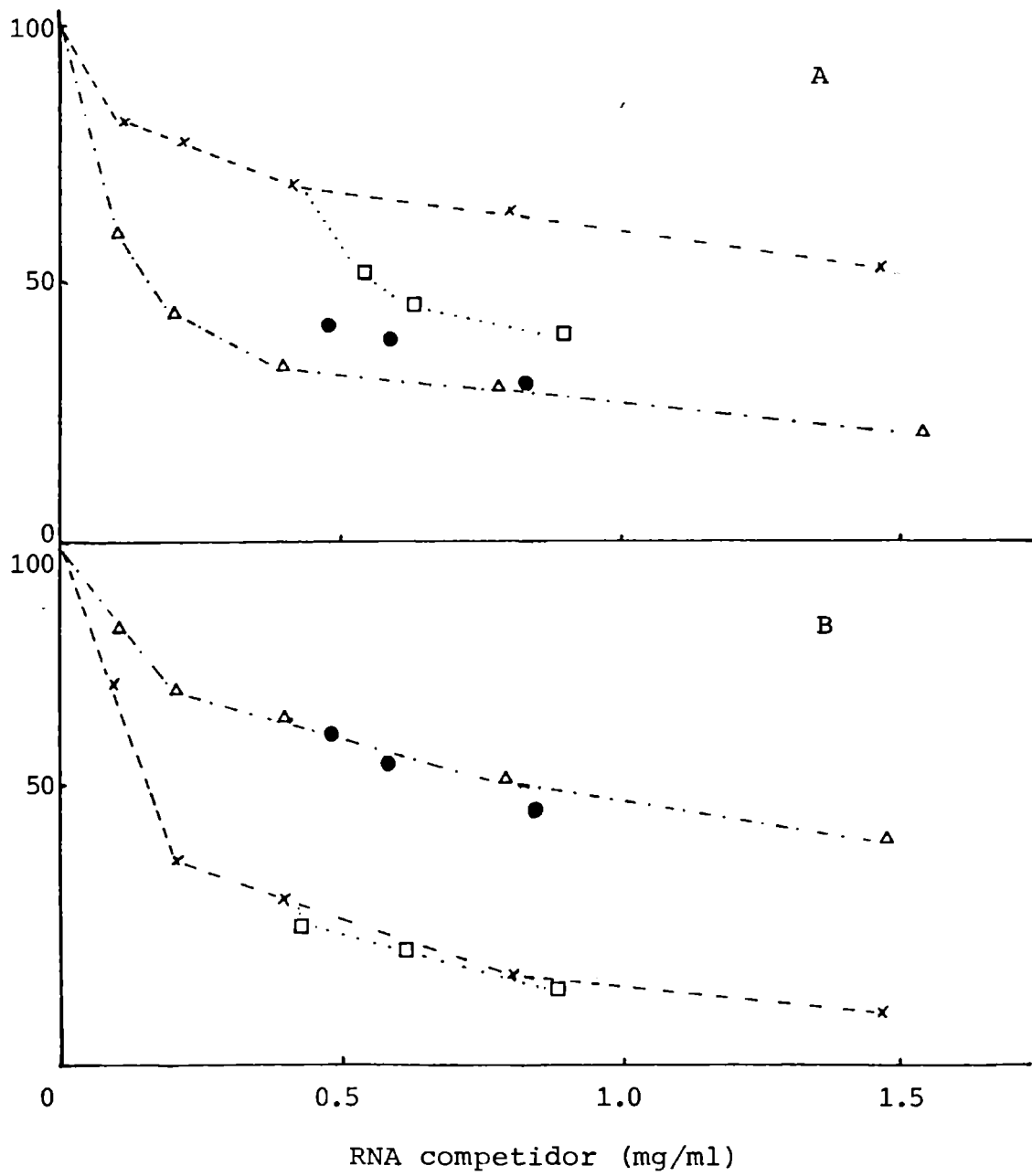
Por lo dicho anteriormente dos cosas nos quedarían por dilucidar: si cesa la síntesis de los RNAs de clase "em" y si se sintetizan aunque sea en pequeña proporción los RNAs de la clase " $m_2l$ ", ya que como dijimos más arriba no se transcriben los RNAs de la clase "1".

Para dilucidar estas dos incógnitas fueron hechos experimentos de hibridización-competición mezcla.

Los RNAs competidores usados fueron: RNA(+) 7 min más el agregado de cantidades crecientes de RNA(+) 10 min, y RNA(+) 28 min más el agregado de cantidades crecientes de RNA(+) Cm 12 min (Ver Introducción, Cuadro 1).

Como se puede observar en la Figura 19A el control se comportó según lo esperado, o sea incremento de la competición en la mezcla RNA(+) 7 min + 10 min y ausencia de tal incremento cuando al 28 min le mezclamos RNA(+) Cm 12 min. Cuando analizamos al  $^3H$ RNA 15-18 min del mutante HA20 (Figura 19B) se observa una mayor competición por el RNA(+) 7 min que por el 28 min, reafirmando la ausencia de RNAs de clase "1" y cuando al RNA(+) 7 min se le agregó 10 min no se observó incremento en el porcentaje de competición, indicando que a la ausencia antes nombrada (clase "1") se le suma la ausencia de la clase " $m_2l$ ". Al analizar la hibridización-competición

Figura 19



Los <sup>3</sup>HRNAs 15-17 min p.i. del fago silvestre (A) y 15-18 min p.i. del mutante HA20 (B) fueron hibridizados a DNA de SP01 (+) y competidos con los RNAs 7 min (x) y RNA(+) 28 min (Δ). Al RNA(+) 7 min (0.437 mg/ml) se le agregaron cantidades crecientes de RNA(+) Cm 12 min (●) ● RNA(+) 10 min (□).

| Bacteriofago | Blanco en ausencia de DNA (cpm) | RNA por tubo (cpm) | Fracción de radioactividad que hibridiza a DNA (%) |
|--------------|---------------------------------|--------------------|--|
| Silvestre    | 21                              | 1648               | 18.3   |
| HA20         | 8                               | 5911               | 1.8  |

mezcla del RNA(+) 28 min + el agregado de RNA(+) Cm 12 min no se observó incremento de la competición tras la mezcla. Esto nos indicaría ausencia de clases tempranas tal como se observó en el silvestre.

Quedaría por dilucidar qué clase de RNAs se estaban sintetizando a ese tiempo que no puedan ser competidos por RNA(+) 28 min más el agregado de RNA(+) Cm 12 min.

Normalmente la síntesis de RNAs de la clase "m" es escasa (alrededor de un 10% y se frena a los 12 min p.i. junto a la clase "em") pero en este mutante no sólo parece haberse bloqueado sino que su control parece haberse relajado. Los conocimientos de que se disponen son que ambas clases de RNAs "em" y "m" se bloquearían por un sistema general que sería el inicio de la síntesis de DNA (46). Según nuestros resultados podemos decir que "em" y "m" podrían ser bloqueados por causas diferentes. Aunque no podemos descartar la hipótesis de que la síntesis de DNA sea el efecto primario pero en ausencia de ésta el sistema disponga sus propios reguladores secundarios.

A tiempos mayores la síntesis de la clase "m" (25-28 min p.i.) parece bloquearse ya que RNA(+) 28 min es capaz de competir un 78% de la marca (Figura 18).

#### DISCUSION DE LOS RESULTADOS

El bacteriofago mutante HA20, representante del cis-trón 27, fue descrito por Okubo y col (115), como deficiente en replicación, y en el presente trabajo presentamos evidencias de que a tiempos muy tempranos (3-7 min) tiene un nivel de transcripción viral más de 10 veces deprimido con

respecto al silvestre al mismo tiempo. Además, hace unos años Glassberg y col. (54) han descripto el hallazgo de dos mutantes termosensibles, del cistrón 27, que presentaban es casa síntesis de DNA y defectos en su programa de transcripción.

Es poco lo que se conoce de este cistrón, y por hallarse tan cercano en el mapa físico al cistrón 28, se hizo necesario definir claramente si eran dos cistrones diferentes.

Un hecho que llama la atención es que estos dos cistrones deben ser transcriptos antes de los 4 min p.i. y en esa zona se ha encontrado un solo promotor temprano (46). Nuestra primera hipótesis es que esa zona sería transcripta como un policistrón desde el gen 27. Una mutación sin sentido en éste podría darnos un fenómeno de polaridad (69, 105) que afecte la expresión del gen 28.

Por ensayos de complementación en medio líquido podemos decir que el par de mutantes HA20-F21 complementaron con relativo buen rendimiento, casi 8 fagos por bacteria infectada. Con estos resultados podemos decir que son cistrones diferentes y que si existiera efecto polar sería muy débil.

Por experimentos de hibridización (Figura 17) observamos que la transcripción viral es máxima entre los 2 a 4 minutos p.i., para luego disminuir marcadamente, hasta 100 veces menos que el silvestre a tiempos tardíos (25-28 min p.i.). Esa brusca caída del nivel de transcripción podría ser atribuída a un gen regulador positivo distinto del gp28 ya que en el mutante HA20 el gp28 es activo. Hecho éste demostrado genéticamente (complementación en medio líquido).

Además, el par HA20-F21 presenta un alto nivel de transcripción viral. Recientemente Chem y col. (25) han descrito por experimentos de transcripción-traducción acoplada que el mutante HA20 es capaz de transcribir a gp28.

Nos quedaba por dilucidar si eran transcriptas todas las clases de RNAs descriptas, pero en menor cantidad, si había carencia de alguna clase y si los inicios y bloqueos de síntesis eran respetados.

Para resolver esta incógnica realizamos experimentos de hibridización-competición y competición mezcla. Por los resultados obtenidos podemos decir que se inicia normalmente la síntesis de los RNAs de las clases tempranas pero entre los 4 a 7 minutos p.i. cae bruscamente el nivel de la masa de RNAs transcriptos. En estas condiciones el bloqueo de los RNAs de la clase "e" parece llevarse a cabo normalmente. Para arribar a esta conclusión nos apoyamos en que a este tiempo (4 a 7 min p.i.) el RNA(+) 7 min es capaz de competir totalmente a la marca, y como este competidor carece de RNAs de clase "e" podemos afirmar que a ese tiempo no son transcriptos RNAs de clase "e".

Después de los 15 minutos p.i., comparando las Figuras 18C y 19B, observamos que las especies de RNAs presentes durante ese tiempo, serían comunes a los competidores RNA(+) 7 min y RNA(+) 10 min, pues ambos son capaces de competir con igual eficacia la marca presente en el híbrido. Las clases de RNAs que cumplen con ese requisito son "em", "m" y "m<sub>1</sub>l"; esto nos haría pensar que los RNAs de la clase "m<sub>2</sub>l" no están presentes. Hecho este que confirmamos por los ensayos de hibridización-competición mezcla (RNA(+) 7 min + RNA(+) 10 min) (Figura 19).

En la Figura 19B mostramos por experimentos de hibridación-competición mezcla que los RNAs de la clase "em" ya habían detenido su síntesis a ese tiempo (15-18 min p.i.). Normalmente éstos lo hacen a los 12 minutos p.i. y si bien no tenemos datos directos pensamos que su freno se puede haber llevado a cabo normalmente. Las evidencias que sostienen lo antes dicho son que la competición por el RNA(+) 28 min más el agregado de cantidades crecientes de Cm 12 min no fueron capaces de incrementar la competición con respecto a lo observado con el RNA(+) 28 min solo. Ahora bien, estos dos, 28 min y 28 min + Cm 12 min, son capaces de competir sólo un 33% de la marca presente. La única clase de RNAs que no puede ser competido por estos dos competidores es la clase "m". A tiempos mayores, 25-28 min p.i., el RNA(+) 28 min es capaz de competir un 79% de la marca mientras que el RNA(+) 10 min se puede decir que compite del mismo orden (86%). Estos resultados nos hacen suponer que a este tiempo ya se produjo el bloqueo de la clase "m".

De la discusión realizada surgen varios interrogantes:

1. Por la escasa masa de RNAs transcriptos podemos suponer que el sistema sólo es capaz de sintetizar unos pocos polipéptidos tempranos, muy escaso grado de proteínas medias y no sintetiza proteínas tardías. Dentro de estos pocos polipéptidos se deberían encontrar los responsables del bloqueo de los RNAs de la clase "em", si es que éste existiese, ya que este freno podría ser atribuido a un efecto más general, tipo factor rho (138, 65). Si bien no se han hecho experiencias "in vivo", podemos imaginar que este bloqueo podría ser atribuido a un sistema también



general, pero de origen viral, tipo TF1. Wilson y Geiduschek (187) han descripto un polipéptido que "in vitro" es capaz de frenar inespecíficamente la transcripción. Este es sintetizado a tiempos tempranos y se acumula en gran cantidad dentro de la célula infectada. Berthold y Geider (10) han descripto que este polipéptido presenta alta homología con la proteína II de *E. coli*. Como ya hemos dicho (Ver Introducción) estas proteínas II serían capaces de inhibir la replicación y frenar inespecíficamente la transcripción (146).

Además Reeve y col (136) habían observado que en presencia de cloranfenicol se lograba incorporar el doble de la masa radioactiva que en ausencia de éste. Quizás esta mayor síntesis pueda deberse a la inhibición de la síntesis de proteínas tempranas, como sería TF1, o de algún otro regulador. Sin embargo, no se tiene una noción clara de qué función cumple TF1 "in vivo" ni existen evidencias concretas sobre los responsables del freno de la síntesis de los RNAs de las clases "em" y "m" en ausencia de síntesis de DNA. Por las evidencias presentadas ya no podemos aceptar la postura simplista de que el inicio de la síntesis de DNA sea único responsable del bloqueo de estas dos clases de RNAs ni que sea un mismo producto el responsable del bloqueo de ambas clases.

2. Un mutante del bacteriofago T4, representante del cistrón 45, presenta un fenotipo bastante similar al del mutante del cistrón 27 de SP01, pero en nuestro caso son muchos los pasos que se desconocen y hacen difícil el poder dilucidar a través del conocimiento de otro sistema el rol de gp27. Además del poco conocimiento que tenemos del gp27 hemos encontrado claras diferencias con el gp45. Este último, al estar mutado, se convierte en deficiente en replicación (8). El gp45, al

asociarse con los gp44 y gp62, incrementa el grado de síntesis de DNA (124). No es lógico pensar que el mutante HA20, con un programa de transcripción viral fuertemente afectado, juegue un rol directo en la replicación. Además hace unos años (55) se han obtenido mutantes termosensibles en el cistrón 27 con escasos defectos sobre la síntesis de DNA.

En cuanto al programa de transcripción gp45 se une a la RNA pol modificada por T4 (133) y de alguna manera juega un rol importante en la síntesis de RNAs de las clases tardías (193) e interviene junto con los gp44-62 y gp32 en la desestabilización y mantenimiento de este estado de la doble hélice (89). En nuestro sistema desconocemos qué rol juega el gp27, pero en ausencia de éste tenemos un fenotipo con una marcada falla en transcripción viral media y ausencia de tardía. Esas serían más las características de un gen regulador que de un modulador como el gp45 del fago T4. Se hace necesario un mayor número de conocimientos para descartar la posibilidad de similitudes entre ambos sistemas.

3. En el bacteriofago SP82, estrechamente relacionado con SP01 (79) se ha copurificado, junto con el complejo de la RNA pol modificada por la proteína de 26K o 28K de peso molecular, según los autores (121, 30, 158, 159) un péptido de 18K (2, 3). Estos últimos no ven una activa transcripción viral a partir de promotores medios, cuando al núcleo de la RNA pol bacteriana ( $\alpha\beta\beta'$ ) se le agregaba el polipéptido de 18K, y como era esperado, se observaba una marcada transcripción cuando al núcleo se le agregaba el polipéptido de 26 o 28K.

La ausencia de gp27 presenta un efecto pleiotrópico sobre el programa de transcripción viral, quizás tal efecto

fuese atribuible a que (a) regula la expresión del gp28, (b) o que interviene en la modificación de la RNA pol celular y (c) otro mecanismo, por ejemplo, tipo rho.

Cuando analizamos al polipéptido de 18K de SP82, pensamos que por su unión a la RNA pol podría jugar un rol regulador, quizás similar al gp27. Pero será necesario un mayor conocimiento de estos polipéptidos para saber qué función cumplen dentro del complejo mecanismo transcripcional.

4. Cuando se pretendió traducir en un extracto libre de células, de *E. coli*, los mRNAs de SP82 transcriptos "in vivo" por la RNA pol de *B. subtilis* no se encontró el polipéptido de 28K (64) pero sí se pudo obtener, tanto en presencia como en ausencia de Cm en un sistema acoplado transcripción-traducción de *B. subtilis* (98). Estas observaciones son coherentes con mRNAs procesados pre o post-traducción, como lo sería si fuese policistrónico. Quizás la maduración posterior "in vivo" del gp28 pueda ser mejorada por la expresión de algún otro gen temprano, gp27, o directamente el gp28 es procesado del mRNA 27-28 (hipótesis policistrón 27-28). Aunque no es lógico pensar que una mutación en el posible modulador tenga una alteración previa y casi de la misma magnitud, salvando la diferencia temporal, que la del gen que modula.
5. Recientemente se ha construido un mapa físico del bacteriofago SP01, basado en fragmentos de DNA obtenidos después de tratar a éste con diversas enzimas de restricción (169, 170, 171). En un paso posterior se analizó a qué zona de los fragmentos se unía la RNA pol bacteriana, y a ellos se los llamó promotores tempranos (Pe); a los sitios a los que se unía la RNA pol modificada por gp28 se los llamó promotores medios (Pm), y por último a los que se unía la RNA pol modificada

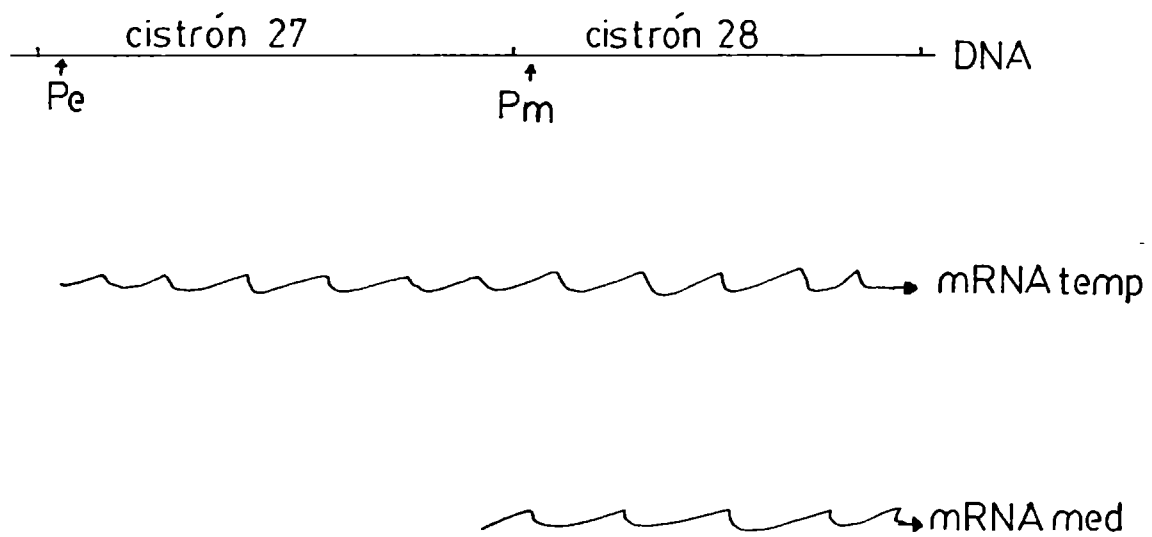
por gp33 y gp34, se los llamó promotores tardíos (Pl) (169, 46).

Por análisis "in vitro" en la región 27-28, mapeada entre los 89 a 91 Kpb, se han ubicado con precisión un promotor temprano y uno medio (25). Si ambos cistrones se transcribieran desde el único Pe, en esa zona, nos quedaría por pensar que en el HA20 hay un efecto polar muy débil, ya que ambos mutantes complementan. Una hipótesis sería (Figura 20) que esta zona, a tiempos tempranos, sea transcripta desde el Pe y como policistrón. Luego del procesamiento y traducción del gen 28, este gp28 podría modificar a la RNA pol para luego transcribir desde el Pm. Pero ante esa hipótesis nos quedaría sin explicar la posible función del gp27.

Después de este análisis todo lo que podemos decir del representante del cistrón 27 es que la ausencia de un gp27 activo altera y bloquea muy temprano al programa de transcripción viral, hecho este que demuestra la necesidad del sistema de este gen regulador positivo. Por otro lado, no es lógico pensar que gp27 pueda modular la expresión de gp28 y que afecte al sistema mucho antes que la expresión de su blanco a modular.

Además un hecho atractivo que presenta este mutante es que a través de él se podría llegar a dilucidar los mecanismos moleculares sobre la represión de la síntesis de las distintas clases de RNAs.

Figura 20



Modelo de transcripción policistrónica temprana y media de los genes 27 y 28.

mRNAtemp: RNA mensajero temprano; mRNAmed: RNA mensajero medio; Pe: promotor temprano; Pm: promotor medio.

## D I S C U S S I O N

## I. NECESIDAD DEL SISTEMA DE UNA DNA TOPOISOMERASA

En el primer capítulo hemos demostrado que SP01 requiere para su expresión una DNA topoisomerasa activa y hemos presentado evidencias genéticas sobre la existencia del producto de un gen/es viral/es que reemplaza a la subunidad A de la DNA girasa bacteriana (167) para formar a la SP01 DNA topoisomerasa.

De nuestro diseño experimental no podemos inferir que esta proteína viral tenga función de corte y reunión en sitios específicos, pero es lógico pensarlo ya que sustituye, en el sistema SP01-*B. subtilis*, a la subunidad de la DNA girasa celular que posee esa función. Por otro lado, todas las DNA topoisomerasas II descritas superenrollan negativamente al DNA según un modelo de acción más o menos general, el cual implica un reconocimiento de los sitios específicos de unión al DNA y el corte de ambas cadenas.

Podríamos suponer que la función viral se uniría a la subunidad B de la DNA girasa bacteriana para conformar la enzima activa, ya que en todos los casos conocidos las subunidades de DNA girasa son inactivas cuando se disocian.

Descartamos la formación de una enzima totalmente independiente codificada por el fago porque los experimentos con Novo demuestran el requerimiento de la subunidad B bacteriana.

Por consiguiente, podemos concluir que SP01 codificaría una proteína con función similar a la de la subunidad A, pero ésta sería capaz de reconocer al genoma viral. Quizás podamos explicar la necesidad de este reemplazo a través del conocimiento de otros sistemas.

En *E. coli* (102) se ha demostrado que la DNA girasa se une específicamente al DNA en zonas de 140 pb, segmentos éstos protegidos de la digestión por nucleasas (86). Si bien no se conoce si el corte se produce dentro o fuera de esta zona conservada, la subunidad A lo hace entre timina (T) y guanina (G) en ambas cadenas, reconociendo 4 pb y quedando covalentemente unida al 5' terminal de los segmentos cortados. Estas observaciones fueron hechas (103) sobre DNAs de distintos orígenes que poseían T, aunque para Gellert y col. (50) no hay una regla aparente referente a esta especificidad de escisión.

Una hipótesis lógica sería pensar que SP01, por poseer hmU en lugar de timina, requiera reemplazar a *gyrA* por un producto viral que reconozca la inusual composición de su DNA. Por esta causa la subunidad A podría no reconocer esas 140 pb, o el sitio de corte propiamente dicho, que ahora estaría entre hmU y guanina. Reforzando esta idea, Lee y col. (80) han presentado evidencias de que por la presencia de esta base rara el fago modifica a la RNA pol para transcribir a los promotores medios y tardíos.

Ha sido descripto que otros bacteriofagos, además de SP01, codifican o modifican a la DNA topoisomerasa II. El bacteriofago T4, quizás por poseer hidroximetilcitosina en lugar de citosina, requiere reemplazar a la DNA girasa por la T4 topoisomerasa (88, 165) para replicar su genoma (90). Sin embargo, la enzima viral no sería obligatoriamente necesaria para la transcripción porque la RNA pol bacteriana, como ya dijimos, es capaz de transcribir un DNA relajado. Además, Mac Carthy (95) ha demostrado que T4 es capaz de utilizar alternativamente a la DNA girasa para



transcribir su genoma. El bacteriofago ØX174 (59) utilizaría para su forma replicativa II a una topoisomerasa II' (52) compuesta por  $A_2B_1$  (51). Recientemente se han descrito varios bacteriofagos que utilizan a la DNA girasa para replicar su genoma (ej. T7) y otros que la requieren tanto para replicar como para transcribir (106).

## II. CORRELACION ENTRE EL GRADO DE SUPERENROLLAMIENTO Y LA TRANSCRIPCION VIRAL.

En el Capítulo II describimos que como consecuencia de la inhibición de la subunidad B de la DNA girasa bacteriana, el nivel de transcripción viral se deprime y que las clases de RNA transcriptos resultan alteradas. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en otros sistemas en los que se ha observado que la inhibición de la DNA girasa reduce la capacidad de transcripción (Ver Introducción).

Esta disminución de la síntesis de DNA podríamos atribuirle a una disminución del número de giros negativos en el DNA. Si bien el grado de superenrollamiento del DNA intracelular en bacterias tratadas con inhibidores de la DNA girasa no ha sido medido directamente, se puede sugerir tal pérdida por la determinación de la densidad del DNA purificado y de su velocidad de migración en geles de agarosa, tal como se observó en *E. coli* (28) o en el fago lambda (48, 106, 107) después de inhibir a la DNA girasa con Cou.

En nuestro sistema SP01-*B. subtilis* en presencia de

Novo observamos que se produce la transcripción viral temprana. Esto indicaría que en el proceso de inyección, el DNA del fago adquiriría una configuración tal que sus promotores serían reconocidos por el sistema de transcripción bacteriana. Desconocemos qué grado de superenrollamiento tendría el DNA en estas condiciones. Sin embargo, Reisbig y col. (137) han demostrado que la RNA pol bacteriana se une a DNAs relajados, unión ésta que no es capaz de hacer el "core", y Kubo y col. (76) observaron que en ausencia de supergiros la transcripción caería a la mitad pero seguiría siendo activa. Ahora bien, en otros sistemas (106, 139, 196) se ha demostrado que tanto el grado de transcripción como la formación del complejo de iniciación con la RNA pol es mejorado si el DNA está superenrollado.

En las condiciones antes dichas la síntesis de RNAs tempranos continúa siendo activa aún a tiempos tardíos. Quizás este efecto pueda ser atribuible a que sería necesario un DNA superenrollado negativamente para el freno normal de su síntesis.

En el Capítulo II se presentan evidencias que demuestran que en presencia de Novo los RNAs tardíos no son transcritos. Esta ausencia de transcripción, además de ser causada por el acople entre replicación-transcripción, podría ser atribuida a que por la pérdida del grado de superenrollamiento del DNA la RNA pol modificada por gp33 y gp34 sería incapaz de reconocer a los promotores tardíos.

Rabussay y Geiduschek (129), haciendo una revisión sobre los controles de regulación de SP01, propusieron que el freno de "e" era atribuible a la modificación de la RNA pol por gp28, y en el presente trabajo presentamos evidencias

de que aún en presencia de un gp28 activo es necesario un determinado estado topológico para el freno de esta clase de RNAs. Además, Fujita y col. (38), en un mutante del cistrón 28, aunque no precisa temporalmente el freno "e", sugieren la existencia de tal freno. Añón (5) utilizando el mutante 036 (representante del cistrón 28), observó que es tos RNAs de clase "e" eran frenados a un tiempo relativamente normal.

Como ya vimos en el Capítulo II, la síntesis de RNAs de clases medias parece no ser afectada por Novo. Por lo tanto, podemos suponer que las proteínas del complejo de replicación son transcriptas y que la ausencia de síntesis de DNA no se debe a algún efecto pleiotrópico del antibiótico, sino a la acción directa de Novo sobre la SPO1 topoisomerasa. En esas condiciones la síntesis de RNAs virales tardíos se encuentra casi totalmente bloqueada. Esta inhibición es atribuible a una enzima de replicación que estando inactiva produce disminución del grado de superenrollamiento del DNA, o a que en ausencia de replicación del DNA molde no sería "competente" para ser transcripto, o a la conjunción de ambas causas. Todas estas hipótesis están a favor del acople replicación-transcripción viral tardía. En el bacteriofago T7 se ha demostrado (27) que al inhibir a la replicación con los inhibidores de la DNA girasa no hay transcripción viral tardía. La mayor diferencia con nuestro sistema es que SPO1 además requiere a gyr B activa para frenar la síntesis de RNAs de las clases tempranas; en cambio en T7 su efecto sobre la transcripción viral tardía es estrictamente por acople entre la replicación y la transcripción.

En SP01 esta falta de transcripción viral tardía no puede ser causada por la ausencia de la RNA pol modificada por gp33 y gp34, ya que estos últimos son transcriptos a tiempos tempranos (25) y medios (46) y a esos tiempos la transcripción viral parece ser normal. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la disminución del grado de superenrollamiento influya directamente sobre la capacidad de la RNA pol para reconocer la secuencia del promotor del DNA molde, o sobre las proteínas capaces de formar nucleosomas, que ahora no reconocerían su sitio de unión al DNA.

### III. NECESIDAD DE LA REPLICACION VIRAL PARA LA TRANSCRIPCION VIRAL TARDIA.

En el Capítulo III se estudió el programa de transcripción de los mutantes deficientes en replicación y se observó el acople entre esta última y la transcripción viral tardía. El grado de este acople varió de acuerdo al gen analizado.

La ausencia de transcripción viral tardía en mutantes de los cistrones 27 y 28 es atribuible a un efecto pleiotrópico producido por la carencia de transcripción media, que a su vez originaría la falta de síntesis de los genes 33, 34 y de aquéllos involucrados en replicación. Esta situación que era conocida para mutantes del gen 28 (6, 29) se describe por primera vez en este trabajo para el gen 27. El resto de los mutantes D0 analizados, con excepción del mutante representante del cistrón 21, presentan acople entre la replicación y la transcripción viral tardía, si bien este efecto

es variable de un mutante a otro. En los mutantes representantes de los cistrones 22, 23, 29, 30 y 32 no se observó transcripción viral tardía de la clase "1". Con respecto a los dos cistrones restantes, Añón (5) encontró, en un mutante en el cistrón 29 (F13) y en el del cistrón 31, que éstos eran incapaces de transcribir RNAs de la clase " $m_2$ 1", pero sí "1". Nosotros observamos que esos mismos mutantes pueden transcribir RNAs de la clase "1" pero en baja proporción debido a que la masa de RNAs transcriptos era muy escasa.

Los datos existentes en bibliografía sobre el acople son contradictorios. Como ejemplo de estas controversias analizaremos a uno de los mutantes. Gage y Geiduschek (41) y Fujita y col. (38) han demostrado que el mutante F30 del cistrón 22, en ausencia de replicación, tiene bloqueada la transcripción viral tardía y en especial los RNAs de la clase "1". En el presente trabajo, analizando al mismo representante del cistrón 22, obtuvimos un nivel de transcripción tardía deprimido más de 10 veces con respecto al fago silvestre y con escasa transcripción de las dos clases de RNAs tardíos. Por otro lado, Talkington y Pero (169) no hallaron tal inhibición cuando hicieron análisis por Southern con RNAs marcados de células infectadas con el mutante F17 del mismo cistrón; más aún estos autores encontraron que se producían dos proteínas codificadas por los RNAs de la clase "1". Recientemente, Heintz y Shub (61) han demostrado que esas dos proteínas aparecen después que otras proteínas tardías y que en condiciones de replicación inhibida tienen un nivel de síntesis muy escaso. Estos resultados parecen invalidar los de Talkington y Pero (169) y por ende apoyarían la existencia de acople.

Cuando analizamos "in vivo" el programa de transcripción del mutante HA20, representante del cistrón 27, observamos que tanto su incapacidad para sintetizar DNA como para transcribir RNAs tardíos se debe más a un efecto pleiotrópico que al acople. En este mutante su programa de transcripción se encuentra severamente afectado presentando características fenotípicas de un gen regulador temprano.

Desconocemos el mecanismo molecular por el cual este gen se expresa, pero de su estudio "in vivo" hemos obtenido resultados que definen algunos controles de la regulación de la transcripción. Con respecto a este último punto, podemos decir que ha sido descrito que los RNAs de la clase "e" son frenados por la presencia de un gp28 activo, y que los RNAs de las clases "em" y "m" son bloqueados a un mismo tiempo, ya sea por el inicio de la síntesis de DNA o por gp33 y gp34 al modificar a la RNA pol (129, 174). En el Capítulo II hemos demostrado que además es necesario un cierto estado topológico del DNA para frenar a los RNAs tempranos y en el Capítulo III hemos presentado evidencias de que en ausencia de un gp27 activo ya entre los 15-17 min p.i. la síntesis de RNAs de la clase "em" está frenada, no así la clase "m". Aunque la cuantificación de esta observación es difícil porque la masa de RNAs producida es muy escasa.

El hallazgo de un número limitado de promotores tempranos en el genoma de SP01 (46) sugiere que en este fago debe ser común la transcripción policistrónica. Este fenómeno ha sido descrito con las siguientes variables: en T7 la RNA pol reconocería múltiples promotores y un signo común de terminación (118) y en el bacteriofago lambda donde por el contrario, la transcripción tardía se lleva a cabo

desde un único promotor con múltiples signos de terminación.

En el polycistrón rIIAB del bacteriofago T4 Pribnow y col. (126) han demostrado que existe un promotor medio rIIB<sub>p</sub> dentro del cistrón rIIA y Young y Menard (199) sugieren un mecanismo de "read-through" en el cistrón rIIB.

La existencia de un único promotor temprano en la zona de los genes 27 y 28 nos indujo a pensar que se transcribían en forma coordinada. La traducción de este mensaje tendría posiblemente un codón de terminación al final del cistrón 27 y un sitio de iniciación para gp28 a continuación.

Esta propuesta explicaría la muy baja polaridad de la mutación supresible en el cistrón 27.

Los genes 33 y 34 cuya acción compuesta se requiere para la modificación de la RNA pol para transcribir a los RNAs de las clases tardías, se sintetizan desde un promotor común (36). Resulta tentador formular por analogía la hipótesis de que gp27 y gp28 fuesen comodificadores de la especificidad de la RNA pol bacteriana para producir RNAs medios.

## CONCLUSIONES

1. El bacteriofago SP01 requiere para su desarrollo:
  - a) una función, sensible a Novo, aportada por la bacteria;
  - b) el producto viral de una función, sensible a Nal 150 µg/ml, codificado en su genoma.En este trabajo se llama a la acción enzimática conjunta de ambos polipéptidos "SP01 DNA topoisomerasa".
2. Para la síntesis de DNA de SP01 es indispensable la actividad de la SP01 DNA topoisomerasa
3. La transcripción temprana y tardía de SP01 es afectada por la carencia de la SP01 DNA topoisomerasa.
  - a) No se produce la detención de las clases tempranas.
  - b) No se realiza la síntesis de las clases tardías (aunque esto pueda explicarse por la carencia de replicación).
4. La transcripción media parece no ser afectada por la carencia de la SP01 DNA topoisomerasa.
5. La mayoría de los mutantes D0 son incapaces de sintetizar RNAs tardíos. Este fenómeno ha sido definido como acople entre replicación y transcripción.
6. El mutante HA20 del cistrón 27 posee las siguientes características:
  - a) Disminuye grandemente su nivel de transcripción después de los 4 minutos post-infección.
  - b) Antes de ese tiempo se transcriben en forma mayoritaria especies de RNAs pertenecientes a las clases "e" y "em".



- c) Las especies "e" dejan de sintetizarse normalmente y las "em" ya no son transcriptas entre los 15-18 minutos post-infección.
- d) El mutante HA20 presenta una muy escasa síntesis de RNAs de las clases medias.
- e) El mutante HA20 es incapaz de transcribir RNAs pertenecientes a las clases tardías.

Se propone un modelo por el cual gp27 funcionaría como un control temprano de transcripción.

Se transcribe el artículo 11 del reglamento de tesis:

"La Facultad no se hace solidaria de las opiniones vertidas en una tesis".

## B I B L I O G R A F I A

1. Abdel-Monen, M.; Dürward, H & Hoffman-Berling, H. (1977). Enzymatic and Unwinding of DNA. *Eur. J. Biochem.* 79: 39-45.
2. Achberger, E.C. & Whiteley, H.C. (1980). The Interaction of *E. coli* core RNA Polymerase with Specificity-determining Subunits Derived from Unmodified and SP82-modified *B. subtilis* RNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* 255: 11957-11964.
3. Achberger, E.C. & Whiteley, H.C. (1981). RNA Polymerase from Phage SP82 Infected and Uninfected *B. subtilis*. *J. Biol. Chem.* 256: 7424-7432.
4. Adhya, S. & Gottesman, M. (1978). Control of Transcription Termination. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 967-996.
5. Añón, M.C. (1974) Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, U.N.L.P.
6. Añón, M.C. & Grau, O. (1975). Progresos en Biología. Barbieri y Legname editores. Pag. 109-112. Tucumán, Argentina.
7. Austin, S.; Ziese, M. & Stenberg, N. (1981). A Novel Role for Site Specific Recombination in Maintenance of Bacterial Replicons. *Cell* 25: 729-736.
8. Barry, J. & Alberts, B.M. (1972). In vitro Complementation as an Assay for Bacteriophage T4 DNA Replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 2717-2721.
9. Benzer, S. (1955). Fine Structure of a Genetics Region in Bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 41: 334-338.
10. Berthold, V. & Geider, K. (1976). DNA Replication Proteins. *Eur. J. Biochem.* 71: 445-449.
11. Bolle, A.; Epstein, R.H.; Salser, W. & Geiduschek, E.P. (1968). Transcription during Bacteriophage T4 Development. Synthesis and Relative Stability of Early and Late RNA. *J. Mol. Biol.* 31: 325-341.

12. Bolle, A.; Epstein, R.H.; Salser, W. & Geiduschek, E.P. (1968). Transcription during Bacteriophage Development. Requirements for Late Messenger Synthesis. J. Mol. Biol. 33: 339-352.
13. Brennan, S.M.; Chelm, B.K.; Romeo, J.M. & Geiduschek, E.P. (1981). A Transcriptional Map of the Bacteriophage SP01 Genome. II The Major Early Transcription Units. Virology 111: 604-628.
14. Brown, P.O. & Cozzarelli, N.R. (1979). A Sign Inversion Mechanism for Enzymatic Supercoiling of DNA. Science 206: 1081-1083.
15. Burkholder, P.H. & Giles, N.H. (1974). Induced Biochemical Mutations in *Bacillus subtilis*. Am. J. Bot. 34: 345
16. Canosi, V ; Siccardi, A.G.; Falaschi, A. & Mazza, G. (1976). Effect of Deoxyribonucleic Acid Replication Inhibitors on Bacterial Recombination. J. Bacteriol. 126: 108-121.
17. Cascino, A.; Riva, S. & Geiduschek, E.P. (1970). DNA Ligation and the Coupling of T4 Late Transcription to Replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35: 213-216.
18. Clewel, D.B. (1972). Nature of Col E1 Plasmid Replication in *E. coli* in the Presence of Chloramphenicol. J. Bacteriol. 110: 667-678.
19. Cocito, C. (1974). Origin and Metabolic of the RNA Species Formed the Replication Cycle of Virus 2C. J. Virol. 14: 1482-1497.
20. Coppo, A.; Manzi, A. & Pulitzer, J.F. (1975). Host Mutant (tab D) Induced Inhibition of Bacteriophage T4 Late Transcription. II Genetics Characterization of Mutants. J. Mol. Biol. 96: 601-624.

21. Craig, N.L. & Roberts, L.W. (1980). *E. coli* rec A Protein-directed Cleavage of Phage  $\lambda$  Repressor Requires Polynucleotides. *Nature* 283: 26-30.
22. Crick, F.H.C. (1976). Linking Numbers and Nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 2639-2643.
23. Champoux, J.J.; Yaung, L.S. & Been, M.D. (1978). Studies of the Regulation and Specificity of the DNA-Untwisting Enzyme. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 53-58.
24. Chelm, B.M.; Beard, C. & Geiduschek, E.P. (1981). Changes in the Association between *B. subtilis* RNA Polymerase core and Two Specificity-determining Subunits during Transcription. *Biochemistry* 20: 6564-6569.
25. Chelm, B.M.; Romeo, J.M.; Brennan, S.M. & Geiduschek, E.P. (1981). A Transcriptional Map of the Bacteriophage SP01 Genome: III A Region of Early and Middle Promoters (The Gene 28 Region). *Virology* 112: 572-588.
26. De Antoni, G.L.; Besso, N.; Zanassi, G.E.; Sarachu, A.N. & Grau, O. (1982) (en redacción).
- 26a. Dawnord, J.S. & Whiteley, H.R. (1981). Early RNAs in SP82 and SP01 Infected *B. subtilis* May Be Processed. *J. Virol.* 37: 1075-1078.
27. De Wynaert, M.A. & Hinkle, D.L. (1979). Involvement of DNA Gyrase in Replication and Transcription of Bacteriophage T7 DNA. *J. Virol.* 29: 529-539.
28. Drlica, K. & Snyder, M. (1978). Superhelical *E. coli* DNA: Relaxation by Coumermycin. *J. Mol. Biol.* 120: 145-154.
29. Duffy, J. & Geiduschek, E.P. (1973). Transcription of Specificity of an RNA Polymerase Fraction from Bacteriophage SP01-infected *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* 34: 172-174.

30. Duffy, J. & Geiduschek, E.P. (1975). RNA Polymerase from Phage SP01-infected and Uninfected *B. subtilis*. J. Biol. Chem. 250: 4530-4541.
31. Duffy, J. & Geiduschek, E.P. (1976). The Virus Specified Subunits of a Modified *B. subtilis* RNA Polymerase are Determinants of DNA Binding and RNA Chain Initiation. Cell 8: 595-604.
32. Eisenberg, S.; Scott, J.F. & Kornberg, H. (1979). Enzymatic Replication of ØX174 Duplex Circle. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 295-302.
33. Eiserling, F. (1979). Comprehensive Virology 13: 543-580. ed. Fraenkel-Conrat & R.R. Warner, Plenum Press, Nueva York.
34. Falco, S.C.; Silvin, R. & Rothman-Denes, L.B. (1978). Novel Template Requirements of N4 Virion RNA Polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 3220-3224.
35. Forterre, P. (1980). A Model of Action of the DNA Gyrase. J. Theor. Biol. 82: 255-269.
36. Fox, T.D. & Pero, J. (1974). New Phage SP01 Induced Polypeptides Associated with *B. subtilis* RNA Polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 2761-2765.
37. Fujita, D.J. (1971) Tesis Doctoral (Ph.D.) Universidad de Chicago, USA.
38. Fujita, D.J.; Ohlsson-Wilhelm, B.M. & Geiduschek, E.P. (1971). Transcription during Bacteriophage SP01 Development: Mutations Affecting the Program of Viral Transcription. J. Mol. Biol. 57: 301-317.
39. Gage, L.P. (1969). Tesis Doctoral (Ph.D.) Universidad de Chicago, USA.
40. Gage, L.P. & Geiduschek, E.P. (1967). Repression of Early Messenger Transcription in the Development of a Virulent Phage. J. Mol. Biol. 30: 435-437.

41. Gage, L.P. & Fujita, D.J. (1969). Effect of Nalidixic Acid on Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Bacteriophage SP01 Infected *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* 98: 96-103.
42. Gage, L.P. & Geiduschek, E.P. (1971 ). RNA Synthesis during Bacteriophage SP01 Development: Six Classes of SP01 RNA. *J. Mol. Biol.* 57: 279-300.
43. Gage, L.P. & Geiduschek, E.P. (1971 ). RNA Synthesis of the Transcription Program. *Virology* 44: 200-210.
44. Geider, K. & Kornberg, A. (1974). On the Processive Mechanism of *E. coli* DNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* 249: 3999-4005.
45. Geiduschek, E.P. (1981) Comunicación personal.
46. Geiduschek, E.P. & Ito, J. (1981). En Molecular Biology of Bacilli. ed. D. Dubnau. Vol. I. Academic Press, Nueva York.
47. Gellert, M.; Mizuuchi, K.; O'Dea, M.H. & Nash, A. (1976). DNA Gyrase an Enzyme that Introduces Superhelical Turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 3872-3876.
48. Gellert, M.; O'Dea, M.H.; Itoh, T. & Tomizawa, J. (1976). Novobycin and Coumermycin Inhibit DNA Supercoiling Catalyzed by DNA Gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 4474-4478.
49. Gellert, M.; Mizuuchi, K.; O'Dea, M.H.; Itoh, T. & Tomizawa, J. (1977). Nalidixic Acid Resistance: A Second Genetics Character Involved in DNA Gyrase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 4772-4776.
50. Gellert, M.; Mizuuchi, K.; O'Dea, M.H.; Ohmori, H. & Tomizawa, J. (1978). DNA Gyrase and Supercoiling. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 35-40.

51. Gellert, M.; Fisher, L.M. & O'Dea, M.H. (1979). DNA Gyrase: Purification and Catalytic Properties of a Fragment of Gyrase B Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 6289-6293.
52. Gellert, M. (1981) DNA Topoisomerase. *Ann. Rev. Biochemistry* 50: 879-910.
53. Glassberg, J.; Frank, M. & Stewart, C.R. (1977). Multiple Origins of Replication for *B. subtilis* Phage SP01. *Virology* 78: 433-441.
54. Glassberg, J.; Slomiany, R.A. & Stewart, C.R. (1977). Selective Screening Procedure of the Isolation and Heat-and-cold Sensitive DNA Replication-deficient Mutants of Bacteriophage SP01. *J. Virol.* 21: 54-60.
55. Glassberg, J.; Slomiany, R.A. & Stewart, C.R. (1977). Initiation and Termination Mutants of *B. subtilis* Bacteriophage SP01. *J. Virol.* 21: 147-153.
56. Grau, O.; Ohlsson-Wilhelm, B.M. & Geiduschek, E.P. (1970). Transcription Specificity in Bacteriophage SP01 Development. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35: 221-224.
57. Gregg, J.M. & Stewart, C.R. (1978). Terminal Redundancy of High Frequency of Recombination Markers of *B. subtilis* Phage SP01. *Virology* 86: 530-641.
58. Hall, B.D.; Nygaard, A.P. & Green, M.H. (1964). Detection of Ribonucleic Acid-deoxyribonucleic Acid Complex. *J. Mol. Biol.* 9: 143-154.
59. Hamatake, R.H.; Mukai, R. & Hayashi, M. (1981). Role of DNA Gyrase Subunits in Bacteriophage  $\phi$ X174 Viral DNA Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 1531-1538.
60. Hardford, N. & Sueoka, N. (1971). Chromosomal Location of Antibiotic Markers in *B. subtilis*. *J. Mol. Biol.* 51: 267-286.



61. Heintz, N. & Shub, D.A. (1982). Transcriptional Regulation of Bacteriophage SP01 Protein Synthesis in vivo and in vitro. (En prensa).
62. Hemphill, H.E. & Whiteley, H.R. (1974). Mixed Infections of *Bacillus subtilis* Involving Bacteriophages SP82 and  $\beta$ 22. J. Virol. 14: 1463-1469.
63. Herrero, E.; Orr, E. & Holland, I.B. (1981). Induction of recA Protein: Effect of Inactivation of DNA Gyrase. FEMS Microbio. Lett. 10: 369-372.
64. Hiatt, W. & Whiteley, H.R. (1978). Translation of RNAs Synthesized in vivo and in vitro from Bacteriophage SP82 DNA. J. Virol. 25: 616-629.
65. Hwang, J.Y. & Doi, R.H. (1980). Transcription-termination Factor Rho from *B. subtilis*. Eur. J. Biochem. 104: 313-320.
66. Itoh, T. & Tomizawa, J. (1977). DNA Gyrase in Bacteriophage T7 DNA Replication. Nature 270: 78-81.
68. Itoh, T. & Tomizawa, J. (1978). Initiation of Replication of Plasmid Col E1 DNA by RNA Polymerase, RNase H and DNA Polymerase I. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 409-417.
69. Jacob, F. & Monod, J. (1961). Genetics Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26: 193-211.
70. Johnson, G.G. & Geiduschek, E.P. (1972). Purification of the Bacteriophage SP01 Transcription Factor 1. J. Biol. Chem. 247: 3571-3578.
- 70a. Kana, Y.; Miyashita, T.; Nakamura, K.; Nagata, A. & Imamoto, F. (1981). In vivo Correlation between DNA Supercoiling and Transcription. Gene 13: 173-184.

71. Kikuchi, Y. & Nash, H. (1978). Integrative Recombination of Bacteriophage  $\lambda$ : Requirement for Supertwisted DNA in vivo and Characterization of int. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 1099-1109.
72. Klevan, L. & Wang, J.C. (1980). Micrococcus luteus DNA Gyrase: Active Components and a Model for its Supercoiling of DNA. Biochemistry 19: 5229-5234.
73. Klinkert, M.Q.; Klein, A. & Abdel Monen, M. (1980). Studies on the Functions of DNA Helicase I and DNA Helicase II of *E. coli*. J. Biol. Chem. 255: 9746-9752.
74. Kornberg, A. (1978). Aspects of DNA Replication. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 1-9.
75. Kubo, M.; Kano, Y.; Nakamura, H.; Nagoto, A. & Imamoto, F. (1979). In vivo Enhancement of General and Specific Transcription in *E. coli* by DNA Gyrase Activity. Gene 153: 153-171.
76. Kudo, T.; Jaff  , D. & Doi, R.H. (1981). Free Sigma Subunit of *B. subtilis* RNA Polymerase Binds to RNA. Molec. Gen. Genet. 181: 63-68.
77. Lark, K.G. & Lark, C.A. (1978). recA-Dependent DNA Replication in the Absence of Protein Synthesis. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 537-549.
78. Lark, K.G. (1979). En Biological Regulation and Development ed. R.F. Goldberg. Vol. I. Plenum Press, Nueva York.
79. Lawrie, J.M.; Downard, J.S. & Whiteley, H.R. (1978). Localization of Transcripts Produced in vivo and in vitro on the SP82 Genome. J. Bacteriol. 135: 1158-1161.
80. Lee, G.; Hannet, N.M.; Korman, A. & Pero, J. (1980). Transcription of Cloned DNA from *B. subtilis* Phages SP01. J. Mol. Biol. 139: 407-422.

81. Lee, G.; Talkington, C. & Pero, J. (1980). Nucleotide Sequences of a Promotor Recognized by *B. subtilis* RNA Polymerase. *Molec. Gen. Genet.* 180: 57-65.
82. Lescure, B.; Chestier, A. & Yaniv, M. (1978). Transcription of Polyoma Virus DNA in vitro II. Transcription of Super-helical and Linear Polyoma Virus. *J. Mol. Biol.* 124: 73-85.
83. Levner, M.H. & Cozzarelli, N.R. (1972). Replication of Viral DNA in SPO1 Infected *B. subtilis*. I. Replicative Intermediates. *Virology* 48: 402-416.
84. Levner, M.H. (1972). Replication of Viral DNA in SPO1 Infected *B. subtilis*. II. DNA Maturation during Abortive Infection. *Virology* 48: 417-429.
85. Little, J.W.; Edmiston, S.H.; Pacelli, L.Z. & Mount, D.W. (1980). Cleavage of the *E. coli* lex A Protein by the recA Protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3225-3229.
86. Liu, L.F. & Wang, J.C. (1978). *Micrococcus luteus* DNA Gyrase: a Model for its Supercoiling of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2098-2102.
87. Liu, C.C.; Burke, R.L.; Hibner, V.; Barry, J. & Alberts, B.M. (1979). Probing DNA Replication Mechanisms with the T4 Bacteriophage in vitro System. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 469-499.
88. Liu, L.F.; Liu, C.C. & Alberts, B.M. (1979). T4 DNA Topoisomerase a New ATP-dependent Enzyme Essential for Initiation of T4 Bacteriophage DNA Replication. *Nature* 281: 456-461.
89. Liu, L.F. & Alberts, B.M. (1980). Characterization of RNA primer Synthesis in the T4 Bacteriophage in vitro DNA Replication System. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5701-5712.

90. Liu, L.F.; Liu, C.C. & Alberts, B.M. (1980) Type II Topoisomerase: Enzymes that Can Unknot a Topologically Knot DNA Molecule via a Reversible Double-strand Break. *Cell* 19: 697-708.
91. Losick, R. (1981). Sporulation and Germination. pag. 48-56 ed. Levinson, H.S.; Sonenshein, A.L. & Tipper, D.J. A.S.M. Washington.
92. Mandell, J.D. & Hershey, A.D. (1960). A Fractioning Column for Analysis of Nucleic Acids. *Anal. Biochem.* 1: 66-80.
93. Matter, M.R. & Painter, R.B. (1979). Dependence of Mammalian DNA Replication of DNA Supercoiling. *Biochem. Biophys. Acta* 563: 306-312.
94. Mac Carthy, D. (1979). Gyrase Dependent Initiation of Bacteriophage T4 DNA Replication: Interactions of *E. coli* Gyrase with Novobiocin, Coumermycin and Phage DNA-delay Gene Products. *J. Mol. Biol.* 127: 265-283.
95. Mc Entee, K.; Weinstock, G.M.; Lehman, I.R. (1979). Initiation of General Recombination Catalyzed in vitro by the recA Protein of *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2615-2619.
96. Mende, L.; Timm, B. & Subramanian, A.A. (1978). A Novel Low Molecular Weight DNA Binding Protein from *E. coli*. *FEBS Lett.* 96: 395-398.
97. Mertens, G.; Amann, E. & Reeve, J.N. (1979). Bacteriophage SPP1 Polypeptides Synthesized in Infected Minicells and in vitro. *Molec. Gen. Genet.* 172: 271-279.
98. Milhausen, M.J.; Whiteley, H.R. (1981). In vitro Synthesis of a Peptide which Modifies the Transcriptional Specificity of *B. subtilis* RNA Polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 99: 900-906.

99. Mizuuchi, K; Gellert, M. & Nash, H.A. (1978). Involvement of Supertwisted DNA in Integrative Recombination of Bacteriophage Lambda. *J. Mol. Biol.* 121: 375-392.
100. Mizuuchi, K. & Mizuuchi, M. (1978). Integrative Recombination of Bacteriophage  $\lambda$ : In vitro Study of Intermolecular Reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 1111-1114.
101. Mizuuchi, M. & Mizuuchi, K. (1980). DNA Gyrase Action Involves the Introduction of Transient Double-strand Breaks into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3220-3224.
102. Morrison, A. & Cozzarelli, N.R. (1979). Site-specific Cleavage of DNA by *E. coli* DNA Gyrase. *Cell* 17: 175-184.
103. Morrison, A.; Higgins, N.P. & Cozzarelli, N.R. (1980). Interaction between DNA Gyrase and its Cleavage Site on DNA. *J. Biol. Chem.* 255: 2211-2219.
104. Nagaraja, V. & Gopinatha, K.P. (1981). Involvement of DNA Gyrase in the Replication and Transcription of Mycobacteriophage I3 DNA. *FEBS Lett* 127: 57-62.
105. Nakata, A. & Sthal, F.W. (1967). Further Evidence for Polarity Mutations in Bacteriophage T4. *Genetics* 55: 585-590.
106. Nash, H.A. & Kikuchi, Y. (1977). In Integration and Excision of DNA Molecules. ed. Hofschmider, P.H. & Stalinger, P. Springer-Verlag, Berlin.
107. Nash, H.A. & Kikuchi, Y. (1978). Integrative Recombination of Bacteriophage  $\lambda$ : Requirement Supertwisted DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 1099-1110.
108. Nygaard, A.P. & Hall, B.D. (1963). Formation and Detection of Ribonucleic Acid-deoxyribonucleic Acid Complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 12: 98-104.

109. Nigaard, A.P. and Hall, B.D. (1964). Formation and Properties of RNA-DNA Complexes. *J. Mol. Biol.* 9: 125-133.
110. Ogazawara, N.; Seiki, N. & Yoshikawa, H. (1979). Effect of Novobycin on Initiation of DNA Replication in *B. subtilis*. *Nature* 281: 702-704.
111. Okazaki, R.T.; Okazaki, T.; Sakabe, K.; Sugimoto, K.; Kainum, R.; Sugino, A. & Ywatsuki, N. (1969). RNA Linked Nascent DNA Fragments in *E. coli*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33: 129-141.
112. Okazaki, T.; Kurosaga, Y.; Ogawa, T.; Seki, T.; Shinazaki, S.; Hirose, A.; Fujiyama, A.; Kahara, Y.; Machida, Y.; Tamanoi, F. & Hozumi, T. (1979). Structure and Metabolism of the RNA Primer in the Discontinuos Replication of Prokaryotic DNA. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 203-219.
113. Okubo, S.; Strauss, B. & Stadolsky, M. (1964). The Possible Role of Recombination in the Infection of Competent *B. subtilis* by Bacteriophage Deoxyribonucleic Acid. *Virology* 24: 552-562.
114. Okubo, S. & Yanagida, T. (1968). Isolation of a Supressor Mutant in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* 95: 1187-1188.
115. Okubo, S.; Yanagida, T.; Fujita, D.J. & Ohlsson-Wilhelm, B.M. (1972). The Genetics of Bacteriophage SP01. *Biken J.* 15: 81-97.
116. Orr, E. & Staudenbauer, W.L. (1981). An *E. coli* Mutant Thermosensitive in the B Subunit of DNA Gyrase: Effect on the Structure and Replication. *Molec. Gen. Genet.* 181: 52-56.
117. Oostra, B.A.; Ab, G. & Guber, M. (1980). Involvement of DNA Gyrase in the Transcription of Ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 18: 4235-4245.

118. Pachl, C. & Young, E.T. (1978). Detection of Polycistronic and Overlapping Bacteriophage T4 Proteins. J. Mol. Biol. 112: 69-101.
119. Parker, M. (1979). Tesis Doctoral (Ph.D.), Universidad de California, USA.
120. Pene, J.J. (1968). Host Macromolecular Synthesis in Phage Infected *B. subtilis*. Bacteriol. Rev. 32: 379-386.
121. Pero, J.; Nelson, J. & Fox, T.D. (1975). Highly Asymmetric Transcription by RNA Polymerase Containing Phage SP01-induced Polypeptides and a New Host Protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1589-1593.
122. Pero, J.; Tjian, R.; Nelson, L. & Losick, R. (1975). In vitro Transcription of a Late Class of Phage SP01 Genes. Nature 257: 248-250.
123. Pero, J.; Hannett, N. & Talkington, C. (1979). Restriction Cleavage Map of SP01 DNA: General Location of Early, Middle and Late Genes. J. Virol. 31: 156-171.
124. Piperno, J.R. & Alberts, B.M. (1978). RNA Priming of DNA Replication by Bacteriophage T4 Proteins. J. Biol. Chem. 253: 5174-5181.
125. Pribnow, D. (1975). Nucleotide Sequence of an RNA Polymerase Binding Site at on Early T7 Promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 784-788.
126. Pribnow, D.; Sigurdson, D.C.; Gold, L.; Singer, B.S.; Napoli, C.; Brasius, J.; Dall, T.J. & Nadler, H.F. (1981) rII Cistrons of Bacteriophage T4. DNA Sequences around the Intercistronic Divide and Position of Genetic Landmarks. J. Mol. Biol. 149: 337-376.
127. Pritchard, R.H.; Barth, P.T. & Collins, J. (1969). Control of DNA Synthesis in Bacteria. Symp. Soc. Gen. Microbio. 19: 263-297.

128. Pulleyblank, D.E.; Shure, M.; Tang, A.; Vinograd, J. & Vosberg, H.P. (1975). Action of Nicking-closing Enzyme on Supercoiled and Unsupercoiled Closed Circular DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 4280-4284.
129. Rabussay, D. & Geiduschek, E.P. (1977) en Comprehensive Virology, Vol. 8 eds. H. Fraenkel-Conrat & R. Warner. pag. 1-196, Plenum Press, Nueva York.
130. Rabussay, D. & Geiduschek, E.P. (1979). Relation between Bacteriophage T4 DNA Replication and Late Transcription in vitro and in vivo. Virology 99: 286-300.
131. Rading, C.N. (1978). Genetic Recombination: Strand Transfer and Mismatch Repair. Ann. Rev. Biochem. 47: 847-880.
132. Raina, L.J. & Ravin, A.W. (1979). Correlation between DNA Supercoiling and Ultraviolet Light irradiation. Molec. Gen. Genet. 176: 171-181.
133. Ratner, R. (1974). The Interaction of Bacterial and Phage Proteins with Immobilized *E. coli* RNA Polymerase. J. Mol. Biol. 88: 373-380.
134. Reeve, J.N. & Cornett (1975). Bacteriophage SP01-induced Macromolecular Synthesis in Minicells of *B. subtilis*. J. Virol. 15: 1308-1316.
135. Reeve, J.N. (1977). Bacteriophage Infection of Minicells. Molec. Gen. Genet. 158: 73-79.
136. Reeve, J.N.; Mertens, G. & Amman, E. (1978). Early Development of Bacteriophage SP01 and SP82G in Minicell of *B. subtilis*. J. Mol. Biol. 120: 183-207.
137. Reisbig, R.R.; Woody, A.Y.M. & Woody, R.W. (1981). The Interaction of RNA Polymerase and DNA. Effect on the Helix-coil Transition and Light Scattering. Biochem. Biophys. Acta 652: 294-302.



138. Richardson, J.P. (1974). Attachment of Nascent RNA Molecule to Superhelical DNA. *Biochemistry* 15: 3164-3169.
139. Richardson, J.P. (1975). Initiation of Transcription by *E. coli* RNA Polymerase from Supercoiled and Non-supercoiled Bacteriophage PM2 DNA. *J. Mol. Biol.* 91: 477-487.
140. Riva, S.; Cascino, A. & Geiduschek, E.P. (1970). The Coupling of Late Transcription to Viral Replication in Bacteriophage T4 Development. *J. Mol. Biol.* 54: 85-102.
141. Riva, S.; Cascino, A. & Geiduschek, E.P. (1970). Uncoupling of Late Transcription from DNA Replication in Bacteriophage T4 Development. *J. Mol. Biol.* 54: 103-121.
142. Roberts, J.W. & Roberts, C.W. (1975). Activity of the *E. coli* recA-gene Product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 147-151.
143. Romeo, J.M.; Brennan, S.M.; Chelm, B.M. & Geiduschek, E.P. (1981). A Transcriptional Map of the Bacteriophage SP01 Genome. I the Major Early Promoters. *Virology* 111: 588-603.
144. Roscoe, D.H. (1969). Synthesis of DNA in Phage-infected *B. subtilis*. *Virology* 38: 527-537.
145. Rouvière-Yaniv, J. & Gros, F. (1975). Characterization of a Novel, Low Molecular Weight DNA Binding Protein from *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3428-3432.
146. Rouvière-Yaniv, J.; Yaniv, M. & Germond, J.E. (1979). *E. coli* Binding Protein HU Forms Nucleosome like Structure with Cellular Double-stranded DNA. *Cell* 17: 265-274.
147. Russel, M.; Gold, L.; Monisett, H. & O'Farrel, P.Z. (1976). DNA Replication with Bacteriophage T4 Proteins. *J. Biol. Chem.* 251: 7263-7270.
148. Ryan, M.J. (1976). Coumermycin A1: A Preferential Inhibitor of Replicative DNA Synthesis in *E. coli*. *Biochemistry* 15: 3769-3777.

149. Sanzey, B. (1979). Modulation of Gene Expression by Drugs Affecting Deoxyribonucleic Acid Gyrase. *J. Bacteriol.* 138: 40-47.
150. Sarachu, A.N. (1978). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.
151. Sarachu, A.N.; Añón, M.C. & Grau, O. (1978). Bacteriophage SP01 Development: Defects in a Gene 31 Mutant. *J. Virol.* 27: 483-489.
152. Scott, J.F. & Kornberg, A. (1978). DNA Synthesis. *J. Biol. Chem.* 253: 3292-3297.
153. Scherzinger, E.; Lanka, E.; Morelli, G.; Seiffert, D. & Yuki, A. (1977). Bacteriophage-T7-induced DNA-priming Protein. A Novel Enzyme Involved in DNA Replication. *Eur. J. Biochem.* 72: 543-558.
154. Shub, D.A. (1975). Bacteriophage SP01 DNA-and RNA-directed Protein Synthesis in vitro: Comparison with in vivo Control. *Molec. Gen. Genet.* 137: 171-180.
155. Shub, D.A.; Swanton, M. & Smith, D.H. En Microbiology, pag. 275-275 ASM Washington. 1976.
156. Sigal, N.; Delius, H.; Kornberg, T.; Gefter, M.L. & Alberts, B.M. (1972). A DNA Unwinding Protein Isolated from *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 3537-3541.
157. Simpson, R.B. (1979). The Molecular Topography of RNA Polymerase-promoter. Interaction. *Cell* 18: 277-285.
158. Spigelman, G.B. & Whiteley, H.R. (1974). RNA Polymerase from Phage SP82-infected and Uninfected *B. subtilis*. *J. Biol. Chem.* 249: 1476-1482.
159. Spigelman, G.B. & Whiteley, H.R. (1974). In vivo and in vitro Transcription by Ribonucleic Acid Polymerase from SP82 Infected *B. subtilis*. *J. Biol. Chem.* 249: 1483-1489.

160. Spigelman, G.B. & Whiteley, H.R. (1978). Translation of RNAs Synthesized in vivo and in vitro from Bacteriophage SP82 DNA. *J. Virol.* 25: 616-619.
161. Sternglanz, R.S.; Di Nardo, K.A.; Voelkel, Y.; Nishimura, Y; Iroto, Y; Becheter, K.; Zumstein, L. & Wang, J.C.(1981). Mutations in the Gene Coding for *E. coli* DNA Topoisomerase I Affect Transcription and Transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2747-2751.
162. Stewart, C.R.; Click, B. & Tole, M.F. (1972). DNA Replication and Late Protein Synthesis during SP82 Infection of *B. subtilis*. *Virology* 50: 653-663.
163. Stewart, C.R. & Franck, M. (1981). Limited Role of Parenteral DNA in Replication during Infection by *B. subtilis* Phage SP01. *Virology* 110: 221-224.
164. Southern, E.M. (1975). Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
165. Stetler, G.L.; King, G.J. & Huang, W.M. (1979). T4 DNA-delay Proteins, Required for Specific DNA Replication, from a Complex that has ATP-dependent DNA Topoisomerase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3737-3741.
166. Sugino, A.; Hirase, S. & Okazaki, R. (1972). RNA-linked Nascent DNA Fragments in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1863-1867.
- 166a. Sugino, A.; Higgins, N.P. & Cozzarelli, N.R. (1980). DNA Gyrase Subunit Stoichiometry and the Covalent Attachment of Subunit A to DNA during DNA Cleavage. *Nucleic Acids Res.* 8: 3865-3874.
167. Sugino, A. & Bott, K.F. (1980). *B. subtilis* Deoxyribonucleic Acid Gyrase. *J. Bacteriol.* 141: 1331-1339.

168. Tabak, H.F.; Griffith, J.; Geider, K.; Schaler, H. & Kornberg, A. (1974). Initiation of Deoxyribonucleic Acid Synthesis. *J. Biol. Chem.* 249: 3049-3054.
169. Talkington, C. & Pero, J. (1977). Restriction Fragment Analysis of the Temporal Program of Bacteriophage SP01 Transcription and its Control by Phage-modified RNA Polymerase. *Virology* 83: 365-379.
170. Talkington, C. & Pero, J. (1978). Promoter Recognition by Phage SP01-modified RNA Polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1185-1189.
171. Talkington, C. & Pero, J. (1979). Distinctive Nucleotide Sequences of Promoters Recognized by RNA Polymerase Containing a Phage Coded " $\sigma$  like" Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5465-5469.
172. Tjian, R. & Pero, J. (1976). Bacteriophage SP01 Regulatory Proteins Directing Late Gene Transcription in vitro. *Nature* 262: 753-757.
173. Tjian, R.; Losick, R.; Pero, J. & Hinnebusch, P. (1977). Purification and Comparative Properties of the Delta and Sigma Subunits of RNA Polymerase from *B. subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 74: 149-154.
174. Tjian, R.; Pero, J.; Losick, R. & Fox, T.D. (1977). *In Molecular Mechanisms in the Control of Gene Expression*. Vol. 5, eds. Nierlich, D.P.; R.J. Ruttes & C.F. Fox. Academic Press, Nueva York.
175. Tomich, P.K.; Chien, C.S.; Waccha, M.G. & Greenberg, G.R. (1974). Evidence for a Complex Regulating the in vivo Activation of Early Enzymes Induced by Bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* 249: 7613-7622.
176. Tomizawa, J.I. & Itoh, T. (1981). Plasmid Col E1 Incompatibility Determined by Interaction of RNA I with Primer Transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6096-6100.

177. Trucksis, M.; Golub, E.I.; Zabel, D.J. & Depew, R.E. (1981). *E. coli* and *Salmonella typhimurium* supX Genes Specify Deoxyribonucleic Acid Topoisomerase I. J. Bacteriol. 147: 679-681.
178. Truffaut, N.; Revet, B. & Saulie, M. (1970). Etude comparative des DNA des phage 2C, SP8, SP82 et SP01. Eur. J. Biochem. 15: 391-400.
179. Tse, Y.C. & Wang, J.C. (1980). Covalent Bonds between Protein and DNA. Cell 22: 269-276.
180. Valenzuela, M.S.; Aguinaga, M.P. & Imman, R.B. (1981). Isolation of DNA Fragment Containing Replicating Growing Forks from both *E. coli* and *B. subtilis*. Molec. Gen Genet. 181: 241-247.
181. Van Wrigh, A. & Bridges, B.A.J. (1981). Effect of gyr B Mediated Changes in Chromosome Structure on Killing of *E. coli* by Ultraviolet Light. J. Bacteriol. 146: 18-23.
182. Wang, J.C. (1971). Interaction between DNA in *E. coli* Protein. J. Mol. Biol. 55: 523-533.
183. Wang, J.C. (1974). Interaction between Twisted DNAs and Enzyme; the Effectors of Superhelical Turns. J. Mol. Biol. 87: 797-816.
184. Wang, J.C.; Geunport, R.I.; Jovaherian, K.; Firkegaard, K.; Klevan, L.; Katewicz, M. & Tse, Y.C. (1981). En Mechanistic Studies of DNA Replication and Genetics Recombination, ed. B.M. Alberts and C.F. Fox, Academic Press, Nueva York.
185. Watson, J. & Crick, F.H.C. (1953). Molecular Structure of Nucleid Acid. Nature 171: 737.
186. Watson, J. (1972). Origin of Concatemeric T7 DNA. Nature New Biol. 239: 197-201.
187. Wilson, D.L. & Gage, L.P. (1971). Certain Aspects of SP01 Development. J. Mol. Biol. 57: 297-309.

188. Wilson, D.L. & Geiduschek, E.P. (1969). A Template-selective Inhibitor of in vitro Transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62: 514-520.
189. Willianson, V.M. & Doi, R.H. (1979). Sigma Factor is not Released during Transcription in *B. subtilis*. Molec. Gen. Genet. 174: 147-152.
190. Witkin, E.M. & Wermundsen, I.E. (1978). Targeted and Un-targeted Mutagenesis by Various Inducers of SOS Functions in *E. coli*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43: 881-886.
191. Witner, S.H. (1977). DNA or RNA Priming of Bacteriophage G4 DNA Synthesis by *E. coli* dnaG Protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2815-1822.
192. Witner, S.H. (1978). DNA Replication Proteins of *E. coli*. Ann. Rev. Biochem. 47: 1163-1193.
193. Wu, R. & Geiduschek, E.P. (1975). The Role of Replication Proteins in the Regulation of Bacteriophage T4 Transcription. J. Mol. Biol. 96: 513-538.
194. Wu, R.; Geiduschek, E.P. & Cascino, A. (1975). The Role of Replicative Proteins in the Regulation of Bacteriophage T4: II. Gene 45 and Late Transcription. J. Mol. Biol. 96: 539-562.
195. Wu, R. & Geiduschek, E.P. (1977). Distinctive Protein Requirements of Replication-dependent and Uncoupled T4 Late Gene Expression. J. Virol. 24: 436-449.
196. Yang, H.L.; Heller, K.; Gellert, M. & Zubay, G. (1979). Differential Sensitivity of Gene Expression in vitro to Inhibitors of DNA Gyrase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3304-3308.

197. Yehle, C.O. & Ganesan, A.T. (1972). Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Bacteriophage SP01-infected *B. subtilis*. J. Virol. 9: 263-272.
198. Yehle, C.O. & Ganesan, A.T. (1973). Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Bacteriophage SP01-infected *B. subtilis*. J. Biol. Chem. 248: 7456-7459.
199. Young, E.T. & Menard, R.C. (1981). Sizes of Bacteriophage T4 Early mRNA's Separated by Preparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Identified by in vitro Translation and by Hibridization to Recombinant T4 Plasmid. J. Virol. 40: 772-789.